1973 N° 2

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Marie-Claude SAUX

PHARMACIEN
ASSISTANT AU LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE APPLIQUÉE
DIPLÔMÉE DU CERTIFICAT D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE TOXICOLOGIE
ET HYGIÈNE INDUSTRIELLE
DIPLÔMÉE DU CERTIFICAT D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CONTRÔLE
PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

née le 2 août 1945 à Bergerac (Dordogne)

1er Sujet : ESSAIS D'IDENTIFICATION DES MÉTABOLITES DE QUELQUES BARBITURIQUES COURANTS.

2e Sujet : LES IMMUNOSUPPRESSEURS.

Soutenue le 14 juin 1973 devant la Commission d'Examen :

Examinateurs de la Thèse	Mme S. LARCEBAU, Professeur	*Président*
	M. R. QUILICHINI, Professeur	*Juges*
	M. J. BAILENGER, Professeur	
	M. H. J. LAZARINI, Maître de Conférences Agrégé	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547320_0017

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Marie-Claude SAUX

PHARMACIEN

ASSISTANT AU LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE APPLIQUÉE

DIPLÔMÉE DU CERTIFICAT D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE INDUSTRIELLE

DIPLÔMÉE DU CERTIFICAT D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

née le 2 août 1945 à Bergerac (Dordogne)

1er Sujet : ESSAIS D'IDENTIFICATION DES MÉTABOLITES DE QUELQUES BARBITURIQUES COURANTS.

2e Sujet : LES IMMUNOSUPPRESSEURS.

Soutenue le 14 juin 1973 devant la Commission d'Examen :

Examinateurs de la Thèse

Mme S. LARCEBAU, Professeur	*Président*
M. R. QUILICHINI, Professeur	*Juges*
M. J. BAILENGER, Professeur	
M. H. J. LAZARINI, Maître de Conférences Agrégé .	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A tous ceux

dont l'affection m'est chère

A LA MEMOIRE DU PROFESSEUR CASTAGNOU

Professeur de Toxicologie et Hygiène Appliquée
Pharmacien Chef des Hôpitaux Psychiatriques
Docteur en Pharmacie
Docteur en Médecine
Docteur es Sciences
Membre de l'Académie de Pharmacie
Chevalier de l'Ordre National du Mérite
Officier des Palmes Académiques

Notre Maître n'est plus.

Tant au cours de notre vie d'étudiante qu'au sein de son Laboratoire, nous avons pu apprécier la qualité de son enseignement et bénéficier largement de sa grande expérience scientifique.

Il m'avait inspiré le sujet de ce travail. Pendant trois ans, il m'a guidée et m'a fait profiter de ses conseils avec autant de bienveillance que de richesse.

Cette thèse est la sienne bien plus que la mienne. Qu'il me soit permis de lui rendre hommage et de ressentir très cruellement sa disparition.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. CROKETT

Monsieur le Professeur Cl. VRIGNAUD

Avec nos remerciements.

Monsieur le Professeur H.J. LAZARINI

Maître de Conférences Agrégé de Médecine Légale
et de Médecine du Travail
Chevalier des Palmes Académiques

Nous vous remercions d'avoir bien
voulu accepter de juger ce travail.

Monsieur le Professeur J. BAILENGER

Professeur de Zoologie et de Biologie Animale
Docteur es Sciences
Docteur en Médecine
Officier des Palmes Académiques

Vous avez bien voulu accepter de siéger à notre jury de thèse.

Permettez-nous de vous exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur R. QUILICHINI

Professeur de Pharmacie Galénique et Pharmacologie
Docteur en Médecine
Docteur es Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Chevalier de l'Ordre National du Mérite
Officier des Palmes Académiques

Vous avez permis nos débuts en Chromatographie en phase gazeuse en nous accueillant pendant un an dans votre laboratoire.

Vos précieux conseils ont contribué grandement à l'élaboration de ce travail.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en siégeant à notre jury de thèse, et vous assurons de notre très respectueuse reconnaissance.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Madame le Professeur S. LARCEBAU

Professeur sans chaire (Toxicologie)
Docteur en Médecine
Licenciée es Sciences
Chevalier des Palmes Académiques

Votre sollicitude à notre égard qui n'a jamais cessé de se manifester depuis que vous nous avez accueillie dans votre laboratoire, m'a profondément touchée.

Vous nous faites aujourd'hui le grand honneur de présider notre jury de thèse.

Veuillez trouver, ici, l'expression de notre très vive reconnaissance et de notre entier dévouement.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidée
pour la réalisation de ce travail.

ESSAIS D'IDENTIFICATION DES METABOLITES DE QUELQUES BARBITURIQUES COURANTS

* * *

INTRODUCTION

Lors de nos expertises toxicologiques, la recherche des dérivés barbituriques en chromatographie en couche mince met fréquemment en évidence plusieurs spots sans qu'aucun d'entre eux ait un Rf comparable aux Rf de nos références. Interpréter les résultats et conclure à la présence de tel ou tel barbiturique est de ce fait délicat. Le but de ce travail est d'essayer d'identifier à partir de ses produits de dégradations le dérivé toxique pouvant être à l'origine de la mort ; pour cela nous avons associé la chromatographie en phase gazeuse à la chromatographie en couche mince.

Dans la première partie, après avoir rappelé les techniques et les conditions opératoires nous avons entrepris l'étude des produits d'hydrolyse alcaline de cinq barbituriques courants en thérapeutique : Phénobarbital, Barbital, Butobarbital, Secobarbital, Hexobarbital.

Dans la seconde partie nous avons administré per os à des rats les barbituriques cités précédemment à dose susceptible de provoquer un coma carus sans décés. Nous avons ensuite suivi l'excrétion des métabolites urinaires pendant les huit premiers jours, et tenté leur identification.

PREMIERE

PARTIE

C H A P I T R E I

***

Ce chapitre sera consacré à l'exposé des différentes techniques chromatographiques mises en oeuvre pour la réalisation de ce travail.

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES EN COUCHES MINCES

***

LES SUPPORTS :

Deux variétés de gel de silice Merck ont été utilisées :

. Gel de silice G selon Stahl n° 7 731,
. Gel de silice GF 254 selon Stahl n° 7 730 réservé à l'étude des substances absorbant en U. V. (254 mμ).

LES PLAQUES :

Plaques de verre DESAGA standardisées, de dimensions 20 x 20 cm. Le gel de silice est étalé sur une épaisseur de 0,5 mm

LES ELUANTS :

Nous avons retenu deux types d'éluants qui nous ont permis, outre une bonne séparation des différentes substances, également une rapidité de migration satisfaisante. (46)

- Eluant alcalin A : benzène-acétone-ammoniaque (50-50-2) CASTAGNOU-ARTIGES (6)
- Eluants neutres B :
  - B_1 : chloroforme-éthanol (80-20) (27)
  - B_2 : chloroforme-acétone (90-10) (44) (45)
  - B_3 : chloroforme-éther sulfurique Merck (85-15) (27

Nous signalons que :

. l'éluant A, ammoniacal, assure au mieux la séparation des divers Barbituriques ,

. les éluants neutres, du type B, permettent par contre de mettre en oeuvre directement sur les spots, certaines réactions analytiques d'identification de fonction organique.

LES REVELATEURS

Réactifs généraux des Barbituriques

* Réactif de LEMAIRE au sulfate mercurique (solution A) (33)(7)

HgO		5 grammes
SO_4H_2		20 ml
H_2O	q. s. p.	100 ml

* Réactif à la diphénylcarbazone (solution B) (33)

. Diphénylcarbazone · 10 mg
. Chloroforme 100 ml

- Technique :

Pulvériser sur le chromatogramme séché, d'abord la solution A, puis immédiatement après, la solution B préparée extemporanément.

- Résultat :

Des spots allant du bleu clair au rose violet foncé apparaissent sur un fond mauve. Les colorations sont fugaces dans le temps ; elles réapparaissent par nouvelles pulvérisations des réactifs.

* Réactif de LE MOAN (23)

Sol. A	$HgCl_2$	2 g
	Ethanol à 95°	100 ml
Sol. B	Diphénylcarbazone	0,05 g
	Chloroforme	100 ml

Mélanger ces deux réactifs à volumes égaux au moment de l'emploi.

- Technique :

Pulvériser abondamment le réactif
Porter la plaque à l'étuve (température : 60° à 80

- Résultat :

Des spots violacés, correspondant aux barbituriques apparaissent lors de la pulvérisation ; la couleur du fo s'atténue et l'intensité de teinte des spots s'accentue lors du passage à l'étuve.

Révélateurs des fonctions organiques : (37)

* Détection des fonctions acide ou basique :

Réactif de GUILLAUMIN

- Réactif :

Rouge de méthyle	0,125 g
Bleu de bromothymol	0,400 g
NaOH N/20	19 ml
Eau distillée q. s. p.	1 000 ml

- Technique :

Pulvériser le réactif sur le chromatogramme bien se

- Résultat :

Les spots présentant un caractère acide se colorent en jaune, rose ou rouge selon la force croissante de l'acide, ceux présentant un caractère basique deviennent vert ou bleu.

* Détection du groupement NH : Réaction de chloruration (25)

- Réactifs :

. Solution saturée de chlore dans du tétrachlorure de carbone. Mélanger en agitant fortement.

CCl_4	100 ml
$KMnO_4$ à 3 g p. 100	100 ml
HCl 4 N	100 ml

Laisser déposer la phase tétrachlorurée.

. Solution d'Ortho-Toluidine dans l'acide acétique glacial. Dissoudre 1 mg d'Ortho-Toluidine dans 10 ml de CH_3COOH. Ajouter 20 à 30 ml d'H_2O puis 4 mg d'IK. Compléter à 1 000 ml avec H_2O.

- Technique :

Introduire la phase tétrachlorurée dans une cuve à chromatographier.

Attendre que le chlore ait saturé l'atmosphère.

Introduire la plaque et la maintenir pendant 3 à 4 minutes.

Eliminer l'excès de chlore retenu sur le gel par chauffage à l'étuve.

Pulvériser ensuite la solution d'Ortho-Toluidine.

* Détection des substances non saturées : réactif au $KMnO_4$ en milieu sulfurique (53)

- Réactif :

$KMnO_4$	100 mg
SO_4H_2	1 ml
H_2O distillée q.s.p.	100 ml

- Technique :

Pulvériser le réactif sur le chromatogramme séché.

- Résultat :

Des taches blanches ou légèrement jaunes sur fond rose illustrent les spots de substances insaturées.

* Détection du groupement NH_2 : réactif au p diméthylamino-benzaldéhyde

- Réactif :

p. diméthylaminobenzaldéhyde : 1 gramme
mélange éthanol-HCl (95-5) q.s.p. : 100 ml

- Technique :

Pulvériser le réactif sur le chromatogramme.
Placer la plaque à l'étuve à 90° pendant 5 minutes.

- Résultat :

Des spots jaune vif correspondant aux groupes NH_2 présents dans les molécules apparaissent peu à peu.

* Détection du groupe méthylène actif : réactif au métadinitrobenzène (25)

- Réactifs :

. Potasse en pastilles 20 g
Méthanol q. s. p. 100 ml

. Méta-dinitrobenzène 1g
Méthanol q. s. p. 100 ml

- Technique :

Pulvériser la solution de KOH alcoolique puis quelques minutes plus tard, le m-dinitrobenzène.

- Résultat :

Les spots apparaissent lentement lors du séchage.

* Détection du groupe carbonyle :

réactif à la dinitrophénylhydrazine (53)

- Réactifs :

. mélange à poids égal d'acide trichloroacétique et d'eau distillée : 100 ml

. 2,4 dinitrophénylhydrazine q. s. à saturation

- Technique :

Pulvériser le réactif sur le chromatogramme préalablement séché.

- Résultats :

Les substances à groupe carbonyle sont caractérisées par la présence de spots rouge orangé sur le fond jaune du chromatogramme.

* Détection des fonctions carbamiques : réactif au Furfural (26) (32)

- Réactif :

Acide chlorhydrique ou acide ortho-phosphorique pur : 100 ml
Furfural : 20 ml.

- Technique :

Pulvériser le réactif, préparé extemporanément, sur le chromatogramme séché.

- Résultat :

Les fonctions carbamiques donnent, avec le furfural, des spots de coloration bleu noir.

* Détection du Brome dans les molécules :

réactif à la fluorescéine (13) (26)

- Réactifs :

. Fluorescéine : 1 g
Ac. acétique glacial : 100 ml

. H_2O_2 à 10 volumes : 30 ml
H_2O q. s. p. : 100 ml

Mélanger les deux solutions ci-dessus. Ajouter au réactif quelques gouttes d'une solution à 0,5 p. 100 de $CuSO_4$. Chauffer quelques minutes à 50 °C. Le réactif est prêt à l'emploi.

- Technique :

Pulvériser le réactif chaud sur le chromatogramme séché.

- Résultat :

Les substances contenant des atomes de Br donnent des spots roses sur le fond jaune du chromatogramme.

* *
*

TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

***

1 - APPAREILLAGE

LE CHROMATOGRAPHE

Nous avons utilisé le chromatographe Biochemical modèle 402 de chez HEWLETT PACKARD muni :

- de deux électromètres,
- de deux enregistreurs simple piste,
- d'un détecteur à ionisation de flamme.

LES COLONNES

Ce sont des colonnes en verre, en forme de U, de 1,20 m de long et de 4 mm de diamètre intérieur.

SUPPORTS ET PHASES

(40) (22) (38) (58) (41) (28) (20) (8)

Supports	Phases stationnaires	Températures
Chromosorb. Q 80.100 mesh	Carbowax 20 M 10 %	Soit en isotherme à 140°
Chromosorb. G 80.100 mesh	ou SE 52 2,5 % / SE 30 5 %	soit en température programmée
Diatoport S 80. 100 mesh	OV_1 1 % / OV_{17} 1 %	de 70° à 210°

LES GAZ

	Pression	Débit
Azote	1,8 kg	30 ml/mn
Hydrogène	0,8 kg	28 ml/mn
Air comprimé	2,2 kg	35 ml/mn

SERINGUES

Hamilton de 1 µl et 5 µl.

2 - PREPARATION DES ECHANTILLONS A CHROMATOGRAPHIER

De nombreux auteurs (8) ont signalé la polarité importante du noyau barbiturique et les inconvénients qui en découlent lors de l'analyse en chromatographie en phase vapeur. Une réduction de cette polarité est donc nécessaire afin d'obtenir des pics symétriques ne présentant pas de traînées.

Parmi les méthodes connues jusqu'à ce jour et couramment utilisées par les différents auteurs, il faut citer :

- la silylation (36) (43)
- la méthylation (2) (10) (29) (41)
- l'acétylation.

La bibliographie nous ayant permis de rejeter la silylation, nous avons retenu essentiellement la méthylation et accessoirement l'acétylation afin d'essayer de mettre en évidence les produits de dégradation des molécules barbituriques à fonctions hydroxylées pouvant se former lors de leurs dégradations chimiques ou biologiques.

LA METHYLATION

Parmi les produits pouvant servir à méthyler, notre choix s'est porté sur le sulfate de diméthyle utilisé selon la technique décrite par MARTIN et DRISCOLL (29)

* Réactifs :

- Sulfate de diméthyle,
- Solution méthanolique saturée de K_2CO_3 :
  - . méthanol : 90 ml
  - . eau distillée : 10 ml
  - . K_2CO_3 q. s. à saturation
- Tampon acétique pH 6:
  - . Sol. A : 12 g/1 000 d'acide acétique
  - . Sol. B : 16,4 g/1 000 d'acétate de Na anhydre

  Mélanger 4,8 ml de A, 45,2 ml de B et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Hexane

Nota : L'Hexane peut être remplacé par de l'heptane ; l'extraction est dans certains cas bien meilleure. (42)

* Technique :

Evaporer à sec la sol. de l'échantillon à analyser.
Ajouter 2 ml de sol. méthanolique de K_2CO_3 puis 0,2 ml de sulfate de diméthyle.
Chauffer au B. M. à 57 °C $\pm$ 1 °C pendant 4 minutes.
Evaporer l'alcool méthylique sous vide.
Ajouter 1 ml de tampon acétique.
Extraire par deux fois avec 1 ml d'hexane.
Réunir les phases organiques, les évaporer à sec sous azote.
Reprendre le résidu sec par le sulfure de carbone.
Injecter 1 µl.

L'ACETYLATION

* Réactif :

Mélange acétylant :

- anhydride acétique : 5 volumes
- pyridine : 1 volume.

* Technique :

La solution de barbiturique à analyser est évaporée à sec. Au résidu ajouter 0,2 ml du mélange acétylant, préparé extemporanément.

Poursuivre l'acétylation pendant 1 heure à 60 °C.

Evaporer sous azote.

Reprendre le résidu par l'acétone.

Injecter 1 µl.

Remarque :

Afin de démontrer qu'aucun des réactifs mis en jeu n'intervient dans l'analyse chromatographique des substances, nous avons pratiqué des essais à blanc de ces réactifs que nous avons traités selon les techniques de méthylation et d'acétylation décrites ci-dessus.

Il ne nous a pas été permis de dire que ces réactifs pouvaient donner des pics parasites lors de la chromatographie en phase gazeuse.

* *
*

EXPOSE DES CONDITIONS OPERATOIRES

***

L'exposé est divisé en plusieurs paragraphes.

Le premier est consacré à la détermination statistique de la valeur des Rf des divers barbituriques purs, étudiés en chromatographie en couche mince. La dispersion des Rf obtenus sécurisera nos résultats futurs lors de l'expérimentation biotoxicologique.

Le deuxième est consacré à une étude comparative effectuée dans le même but, mais portant cette fois sur les temps de rétention obtenus, pour chacun des barbituriques, en chromatographie en phase gazeuse.

Le troisième définit les conditions d'hydrolyse alcaline des barbituriques étudiés. Au cours de cette opération nous avons cherché, en fonction de différents facteurs et des conditions opératoires, à créer en totalité ou en partie des "métabolites chimiques".

Dans le quatrième nous avons tenté, par chromatographie en couche mince, d'isoler et d'identifier les principales fonctions de ces métabolites en appliquant à leurs spots des réactions analytiques aussi spécifiques que possible.

Enfin, dans le cinquième et dernier paragraphe, le même but séparatif précédemment indiqué a été tenté par chromatographie en phase gazeuse.

1 - ETUDE STATISTIQUE DES Rf DE DIFFERENTS BARBITURIQUES OBTENUS EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Lors des chromatographies en couche mince nous avons constaté que les valeurs des Rf des substances étudiées n'étaient pas automatiquement reproductibles d'une chromatographie à une autre.

Une valeur statistique était donc intéressante à connaître.

Quatre facteurs peuvent intervenir :

- la température ambiante,
- la préparation de l'éluant,
- la quantité de substance mise en oeuvre,
- la qualité du gel de silice.

MODE OPERATOIRE :

* Matériel :

- plaques de verre DESAGA recouvertes de gel de silice G,
- cuves à chromatographier DESAGA, pouvant contenir 5 plaques,
- micropipettes de 15 µl.

* Eluant :

B. A. A. (50-50-2).

* Solution à chromatographier :

Ce sont des solutions étalons de barbiturique à la concentration de 10 mg de produit pur par ml de solution alcoolique.

* Dépôts :

Ils sont de 5 à 10 µl de solutions étalons ; soit quantitativement 50 et 100 µg de substance mise en oeuvre.

Il ne nous était pas techniquement possible de faire migrer les plaques dans une enceinte isotherme. Mais le choix de l'éluant B. A. A. à vitesse de migration rapide (17 mn pour 10 cm) tend à limiter au maximum l'influence de la température.

L'utilisation de cuves pouvant contenir cinq plaques migrant simultanément dans un même volume d'éluant permet de diminuer le facteur dû à l'éluant qui est d'ailleurs une phase homogène.

Nous n'avons pas constaté de variations de Rf pour les différentes quantités de substances chromatographiées.

RESULTATS :

Nous les indiquerons séparément pour chaque barbiturique.

2 - ETUDE STATISTIQUE DES TEMPS DE RETENTION MOYENS DES BARBITURIQUES OBTENUS EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons calculé pour des conditions expérimentales précises, les temps de rétention de différents barbituriques.

Nous n'avons pas pu déterminer le temps de rétention réduit par rapport au pic de l'air car notre appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme qui répond mal au passage de l'air. Nous avons donc établi un temps de rétention relatif c'est-à-dire le rapport des distances des pics de solutés à la valeur correspondante du pic d'un soluté connu, introduit dans le mélange comme étalon.

MODE OPERATOIRE :

* Matériel :

C'est celui décrit dans la technique générale page 11

* Phases :

Nous avons utilisé OV_1 - OV_{17} - SE_{30}.

* Températures :

- Injection : 160°
- Colonnes : programmation 70° à 200°
- Détecteur : 230°.

* Solution à chromatographier :

1 ml de solution étalon à 1 mg de produit pur dans l'alcool absolu.

- Méthylation selon la méthode générale mentionnée page
- Après méthylation reprendre le résidu hexanique par 1 ml de S_2C
- Injecter 1 µl à l'aide d'une seringue Hamilton.

Le choix de l'étalon interne s'est porté sur le barbital car cette substance présente deux avantages : (1)

- en premier lieu, un temps de rétention court,
- en deuxième lieu, de se dégrader très faiblement dans l'organisme et de se rencontrer peu souvent en expertise toxicologique.

RESULTATS :

Nous les indiquerons séparément pour chaque barbiturique.

Remarque :

La connaissance du Rf moyen et du temps de rétention moyen n'exclut pas le fait que, pour chaque identification et dosage, il faut opérer comparativement à un étalon réalisé dans les mêmes conditions.

3 - HYDROLYSE DES BARBITURIQUES

Les conditions opératoires sont mentionnées comme suit :

* Réactifs :

- lessive de soude : 5 ml
- eau distillée : 45 ml.

* Mode opératoire :

Dans un erlenmeyer introduire 500 mg de produit pur. Ajouter 50 ml du mélange hydrolysant.

Chauffer au B. M. bouillant sous réfrigérant ascendant. Le temps d'hydrolyse sera précisé pour chaque barbiturique. Refroidir.

4 - EXTRACTION DES PRODUITS D'HYDROLYSE

L'hydrolyse alcaline en rompant la molécule, comme il l'a été depuis longtemps démontré, libère des fonctions acides dont l'intensité d'ionisation ne peut être a priori connue. Or, leur extractibilité par les solvants organiques est conditionnée par leur libération au moyen d'un acide plus fort qu'eux.

Nous avons craint que l'acide acétique ne soit pas capable d'atteindre toujours ce but, c'est pourquoi nous avons, par ailleurs, utilisé l'acide chlorhydrique.

L'expérience nous a montré que, à quelques rares exceptions près, cette crainte n'était pas justifiée.

L'extraction est pratiquée par l'éther sulfurique comme dans le cas général d'extraction des barbituriques.

* Réactifs :

HCl ou CH_3COOH,

Ether sulfurique,

SO_4Na_2 anhydre,

$CHCl_3$

* Mode opératoire :

Ajouter à la moitié de l'hydrolysat q. s. d'acide acétique pour acidifier.

Vérifier l'acidité du milieu.

Extraire successivement par 50 ml puis par deux fois 20 ml d'éther sulfurique.

Recueillir les phases organiques sur sulfate de sodium anhydre.

Filtrer. Laver quantitativement le SO_4Na_2 à l'éther.

Evaporer à sec l'extractif éthéré.

N. B. : La deuxième moitié de l'hydrolysat est acidifiée par HCl dilué au 1/4 et extraite dans les mêmes conditions opératoires sus mentionnées.

5 - ETUDE DE L'HYDROLYSAT

EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE :

* Apparition des spots en fonction du temps d'hydrolyse :

L'hydrolyse a été arrêtée à des temps progressivement croissants et chaque hydrolysat a été extrait puis chromatographié.

Pour cela, le résidu sec d'extraction éthérée a été repris par 0,5 ml d'alcool éthylique et par dépôts successifs de 10 µl, la totalité de la solution a été répartie sur une plaque de gel de silice G.

La migration s'effectue avec l'éluant B. A. A.

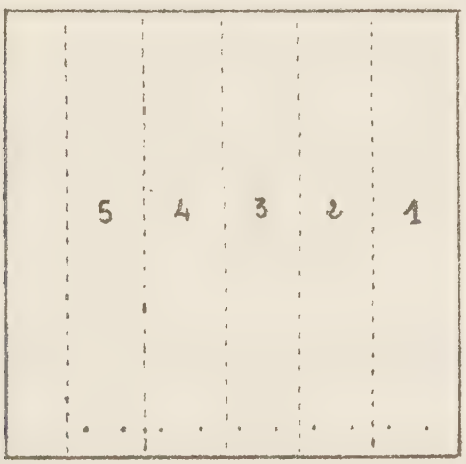
Une fois séchée à l'étuve à 100° la plaque est révélée par le réactif de LEMAIRE et la diphényl-carbazone.

Ceci nous permet, pour chaque barbiturique, de choisir un temps déterminé d'hydrolyse, pour permettre au mieux l'identification de ses produits de dégradation.

* Révélation des fonctions organiques :

L'hydrolysat de notre choix est chromatographié séparément pour mettre en évidence, sur les spots décelables au LEMAIRE, les fonctions organiques réagissant avec les réactifs mis en oeuvre. Nous opérons comme il est indiqué précédemment.

Une fois séchée à l'étuve à 100° la plaque est découpée verticalement, en cinq zones (schéma a).



SCHEMA a

La partie (1) est révélée par le réactif de LEMAIRE à la diphényl-carbazone. Les parties 2, 3, 4 et 5 par des réactifs spécifiques des fonctions organiques.

EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE :

Par cette technique nous avons suivi l'apparition des pics en fonction des temps d'hydrolyse, et étudié un hydrolysat particulièrement riche en produits de dégradation. Dans les deux cas, nous avons utilisé les résidus d'extraction acide que nous avons méthylé selon la méthode page

- Le résidu hexanique est repris par 1 ml de sulfure de carbone,
- Injection d'un microlitre sur colonne OV_{17},
- Température programmée de 70 à 210 °C ,
- Atténuation 10 par 8.

6 - SEPARATION ET ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

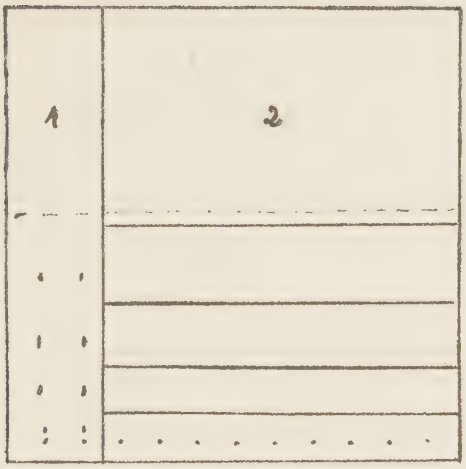
SEPARATION :

Lors des opérations précédentes, un certain nombre de produits résultant de l'hydrolyse alcaline ont été mis en évidence.

Afin de pouvoir les étudier séparément, nous avons soumis le résidu d'extraction éthérée à une chromatographie en couche mince dans les mêmes conditions qu'au paragraphe 5 mais ce chromatogramme a été découpé cette fois en deux parties (1) et (2) (schéma b) de surface nettement différente.

La partie 1 est révélée par le réactif de LEMAIRE et la diphényl-carbazone ce qui assure la visualisation et la disposition des différents spots donc leur localisation exacte tout au long de la surface 2.

Cette partie 2 est ensuite divisée horizontalement en autant de zones que nous avons mis de spots en évidence dans la partie 1.



SCHEMA 6

Dans chaque zone ainsi délimitée, le gel de silice, recueilli quantitativement par grattage, est introduit dans une allonge de verre ayant un tampon de coton hydrophyle à son extrémité distale. Procéder à l'élution par trois fois 5 ml de méthanol. Evaporer à sec l'éluat correspondant à chaque spot.

Nous avons, par cette technique séparé les spots, révélés à la chromatographie en couche mince.

ANALYSE DES RESIDUS OBTENUS EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Méthyler chaque résidu selon la technique générale page

Reprendre le résidu hexanique par 1 ml de S_2C.

Chromatographier 1 µl sur colonne OV_{17} à température programmée de 70 à 210 °C. Atténuation 10 x 10 ou 10 x 8 selon l'importance du pic.

Cette technique permet d'établir une correspondance entre les spots révélés à la chromatographie en couche mince et les pics obtenus à la chromatographie en phase gazeuse.

* *
*

C H A P I T R E II

***

Dans ce chapitre, nous exposerons les résultats obtenus pour les cinq barbituriques étudiés.

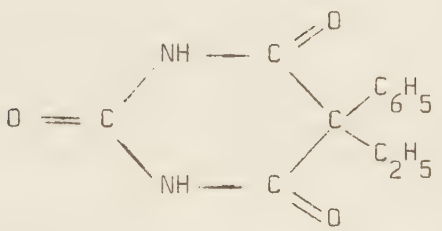
Les conditions opératoires particulières, inhérentes à chaque substance seront précisées pour chaque cas.

PHENOBARBITAL

Gardénal

***

Rappel de la formule : Acide 5 phényl 5' éthyl malonylurée



1 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Détermination du Rf moyen :

Les résultats obtenus portent sur 62 spots. Le Rf moyen trouvé est de 0,42 avec une dispersion de 0,37 à 0,45.

Nous considérons que les valeurs avoisinant 0,40 sont de bonnes approximations.

2 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Détermination du temps de rétention moyen :

En fonction des conditions opératoires décrites précédemment et moyennant 25 chromatogrammes, les temps de rétention moyens du Phénobarbital sont de :

- 1 580 secondes sur colonne OV_{17}
- 1 177 secondes sur colonne OV_{1}

3 - HYDROLYSE

Le Phénobarbital résiste assez énergiquement à l'hydrolyse alcaline.

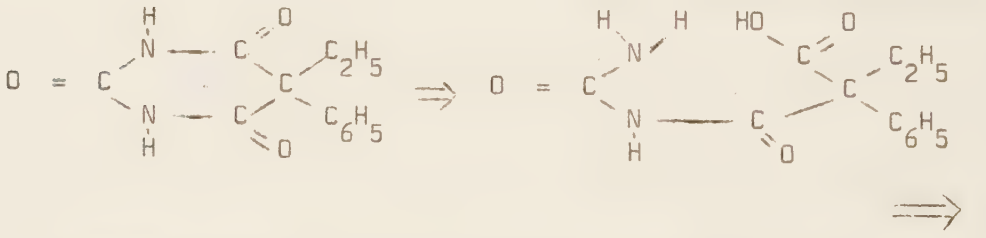
Nous avons constaté :

- qu'il faut 10 minutes pour que commencent à apparaître des produits de dégradation,

- qu'après 1 heure les différentes substances formées existent dans une proportion satisfaisante pour nos expériences et que, passé ce temps, il n'apparaît plus de nouveaux produits de dégradation. Toutefois, une partie non négligeable de produit initial existe encore à l'état intact et peut nous servir de référence.

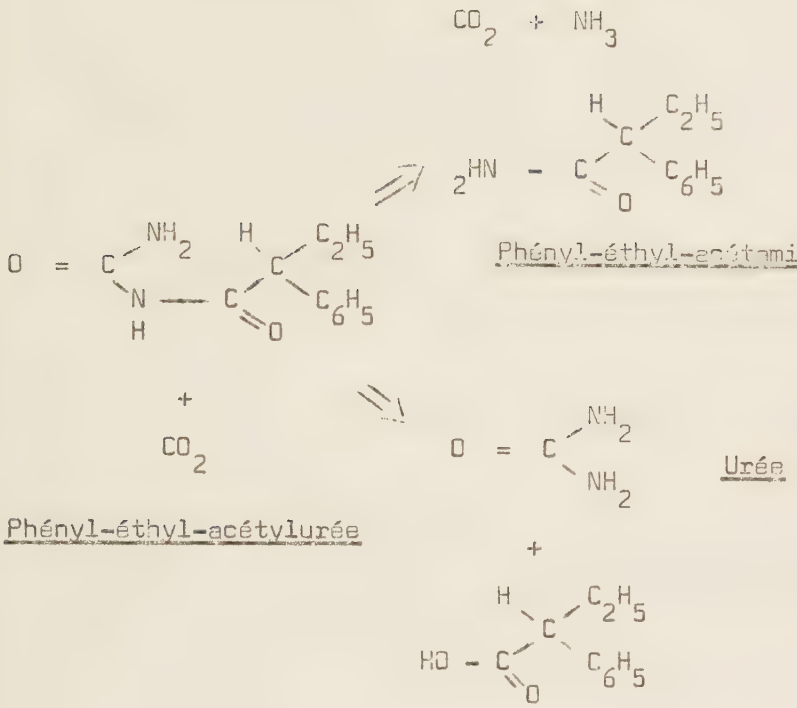
- qu'après 2 heures il est virtuellement détruit.

Avant de donner les résultats expérimentaux obtenus nous avons essayé d'établir, de façon théorique, les transformations pouvant intervenir sur la molécule de Phénobarbital. (57)



Phénobarbital

Acide phényl-éthyl-malonylurique



Observations :

Au cours de nos opérations, nous avons la certitude d'avoir atteint le stade ultime de dégradation de la molécule c'est-à-dire l'urée et l'ammoniaque.

Tout dosage s'est avéré sans intérêt vu les conditions d'alcalinité et la température du milieu.

4 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Les examens préliminaires pratiqués sur les extractifs des hydrolysats d'une heure ont permis la révélation de différents spots. Nous pensons qu'il s'agit des dérivés intermédiaires existant entre le Phénobarbital et l'Ammoniaque c'est-à-dire ceux indiqués dans notre schéma précédent.

Mais il est difficile a priori de les identifier spécifiquement. C'est pourquoi nous avons entrepris leur étude en fonction de leur moment d'apparition.

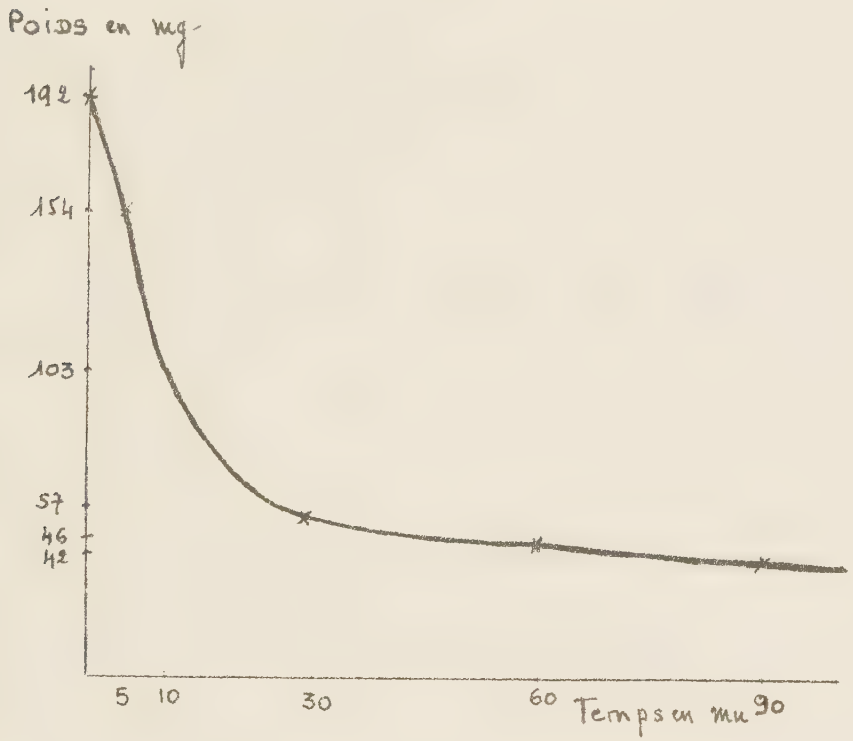
ETUDE EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

Dans ce but, l'hydrolyse a été arrêtée aux temps suivants : 5, 10, 30 minutes puis 1 et 2 heures. Pour chaque temps considéré nous avons opéré sur des échantillons différents. Les extractions ont été effectuées aux périodes sus-mentionnées sur des prélèvements de 20 ml d'un même hydrolysat portant sur une solution étalon à 1,000 g pour 100 de Phénobarbital. De cette étude il ressort les constatations suivantes :

* Les résidus secs pondéraux d'extractions éthérées se sont montrés être de plus en plus faibles.

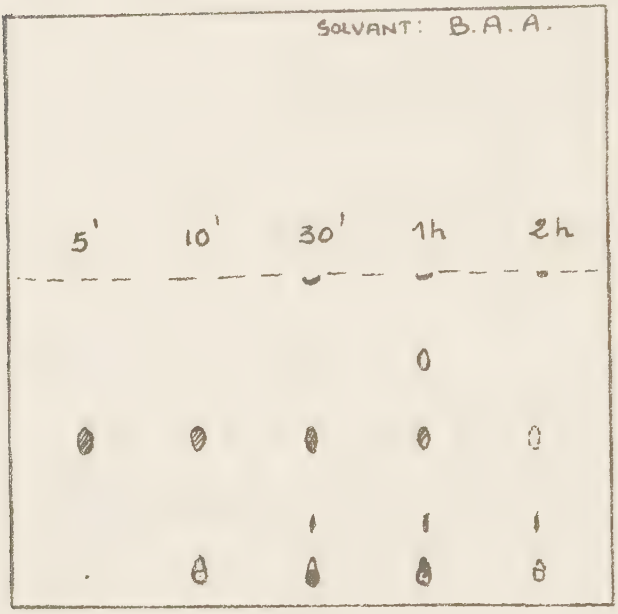
TEMPS	0	5 mn	10 mn	30 mn	1 h	2 h
POIDS TROUVE (pour 200 mg)	192	154	103	57	46	42
RENDEMENT (p. 100)	96	77	51	26	23	21

Il est donc prouvé que la fraction pondérale extractible par solvant de l'hydrolysat préalablement acidifié décroît progressivement dans le temps.



Si l'on peut admettre que la phénylacétamide et l'acide phényl-éthyl-acétique sont extraits dans les conditions opératoires sus-citées, il ressort, pour ce barbiturique, une très nette transformation, dans les premiers temps de l'hydrolyse active, en urée et en ammoniaque. Dans le cas où cette hypothèse serait valable, l'hydrolyse du Phénobarbital ne s'effectuerait pas par cloisonnement horizontal mais par clivage vertical.

* Apparition des spots,: révélation au sulfate mercurique de LEMAIRE et à la diphénylcarbazone.



Observations :

- Pour un temps d'hydrolyse inférieur à 10 mn, on n'observe, en pratique, la formation d'aucun dérivé de dégradation du Phénobarbital.

- Après 10 minutes 2 spots nouveaux se manifestent concomitamment et qui, malgré leur proximité, sont parfaitement individualisés respectivement à Rf 0 et 0,04. Le spot du Phénobarbital est diminué d'intensité.

- Après 30 minutes le spot du Phénobarbital s'amenuise et, outre les deux spots signalés précédemment (qui sont tous les deux plus intenses), il en apparaît un troisième très discret à Rf 0,15.

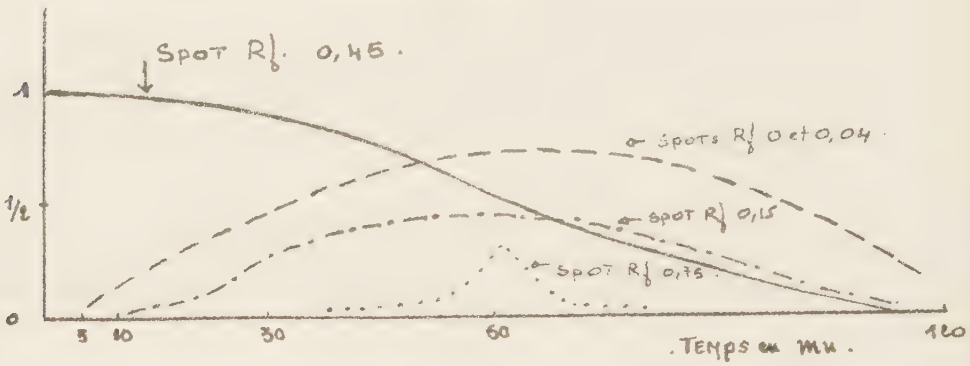
- Après une heure, les spots à Rf 0 et 0,04 croissent toujours en intensité au détriment du spot du Phénobarbital. Il en est de même pour le spot à 0,15. Par ailleurs, un nouveau dérivé de coloration rose s'illustre à Rf 0,75.

- Après 2 heures, le Phénobarbital initial est identifiable mais sans plus. Quant aux autres spots, ou bien ils ont disparu, ou bien leur intensité de révélation s'écroule.

L'ensemble de ces observations est mentionné dans le tableau suivant.

Rf \ Temps	5 mn	10 mn	30 mn	1 h	2 h
0		+	++	+++	+
0,04		+	++	+++	+
0,15			+	++	++
0,45	+++	+++	++	++	+
0,75				+	0
0,99			$\frac{+}{-}$	+	$\frac{+}{-}$

Nous illustrons dans le graphique suivant, outre les temps d'apparition et de permanence des différents spots obtenus, également l'ordre de grandeur de l'intensité de coloration qu'ils donnent vis-à-vis de la réaction au réactif SO_4Hg - Diphénylcarbazone.



ETUDE D'UN HYDROLYSAT D'UNE HEURE

Etant donné que l'extractif correspondant à une heure d'hydrolyse contient tous les dérivés que nous avons été à même de mettre en évidence au cours de toutes les opérations, c'est sur lui, nous le rappelons, qu'ont porté dans un premier temps toutes nos tentatives d'identification par C. C. M.

Le solvant alcalin B. A. A. a été préféré au solvant neutre car il assure une meilleure séparation des spots.

* Révélation par le réactif SO_4Hg - Diphénylcarbazone :

C'est ce moyen d'identification qui nous a permis d'illustrer les spots antérieurement mentionnés. Nous signalons qu'aucun autre réactif n'a été capable de mettre en évidence un plus grand nombre de spots.

Nous rappelons que ce système de réactif, s'il est d'une extrême sensibilité vis-à-vis des Barbituriques ou des molécules possédant le groupement CO-NH-CO, n'est pas spécifique de cette fonction et réagit aussi, dans certains cas, avec les acides organiques et le groupement guanidique.

Ce réactif permet de mettre en évidence l'ensemble des spots suivants :

- au Rf 0, un spot bleu de forme nettement circulaire,

- au Rf 0,04, coiffant le précédent mais nettement différent, un spot mauve en forme de flamme,

- au Rf 0,15, un spot rond présentant deux colorations, bleu au centre et mauve à la périphérie ; dans certains chromatogrammes il est entraîné par le solvant en une forme de traînée bleuâtre,

- au Rf 0,45, un spot violet foncé qui correspond au Rf normal du Gardénal ; mais celui-ci n'est pas de coloration uniforme et présente un contour rose alors que son centre est de couleur violet. Nous pensons qu'il ne s'agit pas ici de la superposition de deux constituants donnant des colorations différentes, mais plutôt d'un phénomène de diffusion circulaire,

- au Rf 0,75, un spot de coloration rose assez faible,

- enfin, au front du solvant, un petit spot secondaire bleu peut apparaître.

* Révélation des fonctions organiques :

Nous rappelons que ces révélations ont été pratiquées sur les C. C. M. obtenues après une hydrolyse d'une heure.

- Détection des groupes acido-basiques :

Les indicateurs de pH permettent cette identification d'une façon simple et aisée.

A l'opposé des éluants neutres qui livreraient les fonctions acides sous forme de spots aisément détectables par cette méthode, les éluants ammoniacaux séparent remarquablement mieux les différents constituants, mais les substances acides sont alors neutralisées par l'ammoniaque et les spots correspondant réagissent mal avec les indicateurs de pH dans le sens qui nous intéresse : celui de la mise en évidence de leur acidité.

C'est en effet ce qu'objective la révélation par ces indicateurs pratiquée sur la plaque après simple dessication spontanée.

Nous avions alors envisagé de dédecter indirectement l'acidité des spots, par la mise en évidence de leurs ions ammoniacaux de saturation en révélant au réactif de NESSLER, mais nous avons constaté, qu'à l'encontre de notre hypothèse, toute la plaque vire uniformément au jaune sans qu'aucun spot ne se manifeste.

Par contre, si la plaque est portée préalablement et durant au moins 5 minutes à 100° les spots acides s'illustrent très aisément aux indicateurs colorés, en jaune ou rouge sur fond verdâtre clair.

Nous avons ainsi mis en évidence les spots réactionnels suivants :

. ceux de Rf 0 de couleur orange ++
. ceux de Rf 0,04 de couleur rose +++
. ceux de Rf 0,75 de couleur jaune pâle +

- Détection du groupe NH :

Deux spots réagissent : celui de Rf 0,04 et celui de Rf 0,75.

- Détection du groupe -C=O :

Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence de spot réagissant avec la phénylhydrazine.

- Détection des groupes réducteurs vis-à-vis du $KMnO_4$

Les spots de Rf 0 et 0,04 sont très faiblement réducteurs, celui de Rf 0,75 l'est faiblement alors que celui de Rf 0,15 est totalement dépourvu de cette propriété.

- Détection des substances absorbant en U. V. (254 mμ)

Le spot de Rf 0,04 absorbe nettement, ceux de Rf 0 et 0,75 moins intensément, celui de Rf 0,15 pratiquement pas.

Les résultats sus-mentionnés concernant les propriétés physico-chimiques de chaque spot sont résumés et illustrés ci-dessous.

Le spot de Rf 0 : acide, faiblement réducteur, absorbe peu en U.V.

Le spot de Rf 0,04 : très acide, réducteur, absorbe fortement en U.V. et réagit avec le P.D.A.B.

Le spot de Rf 0,15 : révélable au LEMAIRE est inactif vis-à-vis de tous les autres réactifs.

Le spot de Rf 0,45 : correspond au Phénobarbital intact.

Le spot de Rf 0,75 : discret, légèrement acide, doué d'un pouvoir réducteur certain, réagit avec le P.D.A.B. et absorbe en U.V.

Les résultats que nous proposons en vue de l'identification des termes de dégradation métabolique par voie chimique du Phénobarbital sont basés sur les observations suivantes :

- une acidité est révélable évidemment pour toute substance à -COOH libre mais aussi pour tout groupement -NH relié de part et d'autre à un groupement -CO.

Rf des spots	LEMAIRE		UV	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	Pdac
	couleur	forme				
0	bleu violet	ronde	+	+	+ −	
0,04	mauve	flamme	++	++	+	+
0,1[illegible]	bleu	ronde				
0,45	violet	ronde	++			
0,7[illegible]	rose	ronde	+	+	−	+
0,99	bleu	flamme	+		+	

- REVELATION DES FONCTIONS ORGANIQUES -

- l'absorption en U. V. est certaine lorsque le groupement pré-cité est présent mais elle est aussi possible avec des dérivés à fonction organique faible.

- le pouvoir réducteur se manifestait du fait de la présence du groupement $-CO-NH_2$.

- enfin, le réactif au P. D. A. B. donne, dans les conditions opératoires préalablement décrites, une réaction positive avec le radical NH_2.

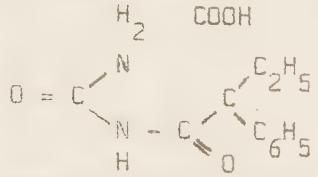
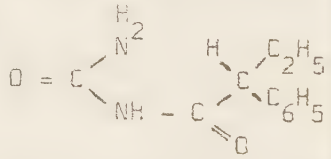
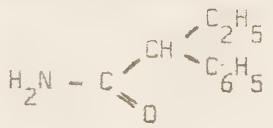
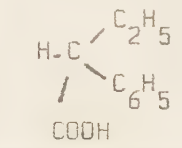
Si nous comparons ces données théoriques aux résultats pratiques constatés par nous en C. C. M. non seulement qualitativement mais aussi en fonction de leur apparition dans le temps, nous sommes amenés à proposer les faits rassemblés dans le tableau suivant où :

- la première colonne rappelle la formule du métabolite considéré,

- la seconde, le Rf auquel le produit a été identifié,

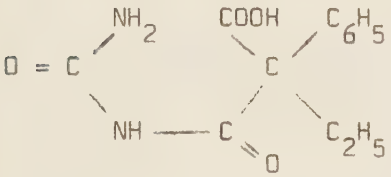
- la troisième, les caractéristiques théoriques de chacun de ces métabolites vis-à-vis des réactifs de révélation utilisés,

- la quatrième, les résultats trouvés.

FORMULES PROPOSEES	Produit identifié au spot de Rf	REACTIONS THEORIQUES	RESULTATS EXPERIMENTAUX
	0,04	Guillaumin ++ U. V. + $KMnO_4$ ++ P. D. A. B. +	Guillaumin +++ U. V. ++ $KMnO_4$ ++ P. D. A. B. +
	0	Guillaumin + U. V. ∓ $KMnO_4$ ++ P. D. A. B. +	Guillaumin ++ U. V. + $KMnO_4$ ++ P. D. A. B. 0
	0,75	Guillaumin 0 U. V. ± $KMnO_4$ + P. D. A. B. +	Guillaumin + U. V. + $KMnO_4$ + P. D. A. B. +
	0,15	Guillaumin + U. V. ∓ $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. 0	Guillaumin + U. V. 0 $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. 0

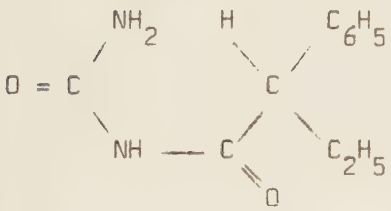
En résumé :

Le métabolite répondant à la formule



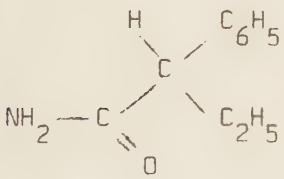
serait celui présentant le Rf 0,04

Le métabolite répondant à la décarboxylation du précédent



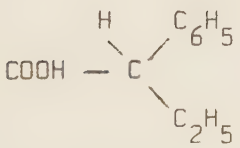
serait celui présentant le Rf 0

Le métabolite répondant à la formule



serait celui présentant le Rf 0,75

Enfin le métabolite classique ultime



serait celui présentant le Rf 0,15

5 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

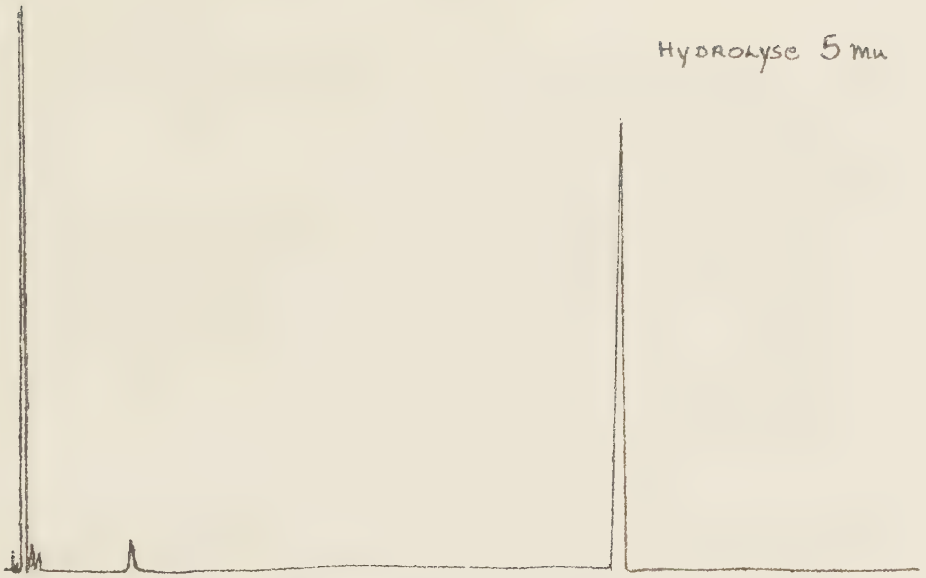
Nous avons opéré, comme dans le paragraphe précédent, sur les résidus des extractifs éthérés totaux provenant de l'hydrolyse arrêtée à des temps progressivement croissants. Le bloc de ces extractifs, après méthylation, a été chromatographié dans les conditions antérieurement mentionnées qui sont aussi strictement les mêmes que celles des Barbituriques purs.

Les temps de rétention ont,dans l'ordre d'apparition les valeurs numériques suivantes :

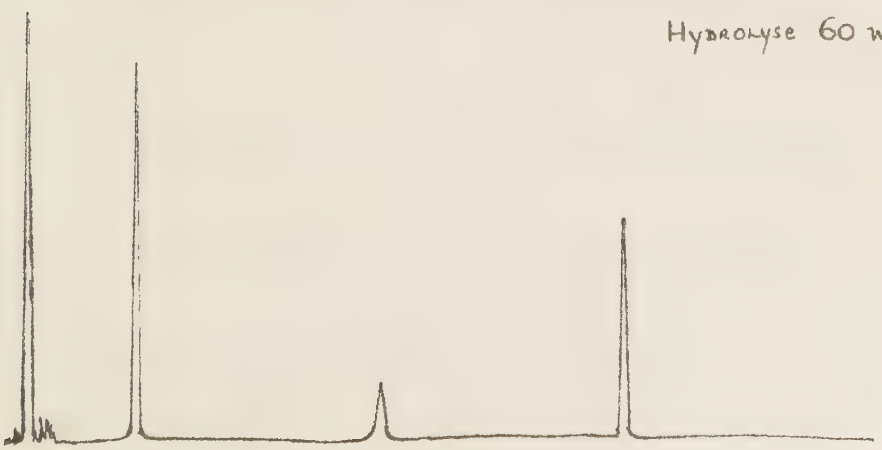
Pic n° 1	295 secondes,
Pic n° 2	936 secondes,
Pic du Phénobarbital	1579 secondes.

Au point de vue quantitatif, nous pouvons apporter les précisions suivantes :

TEMPS (min)	PIC n° 1 (p 100)	PIC n° 2 (p 100)	PIC n° 3 (p 100)	TOTAL (p 100)
0			100	100
5	2	0	74	76
10	10	inf. 1	67	77
30	28	5	44	77
60	35	5	10	50
90	24	3,2	2	29


Hydrolyse 5 mn

Hydrolyse 10 mn.


Hydrolyse 60 mn.

L'examen des courbes et du tableau précédent donne lieu aux observations suivantes :

. le pic n° 1 se développe quantitativement d'une façon beaucoup plus importante que le pic n° 2 et sa quantité ne fait que croître au fur et à mesure que l'hydrolyse se poursuit tout en atteignant son maximum à la soixantième minute, ceci au détriment du Phénobarbital dont la quantité se minimise progressivement jusqu'à sa disparition presque totale à la quatrevingtdixième minute.

. le pic n° 2 se développe beaucoup moins intensément mais, avec un léger retard dans le temps, parallèlement au pic n° 1. Il atteint son maximum d'intensité à la soixantième minute pour décroître par la suite.

On constate encore :

- qu'à la cinquième minute 25 p 100 du Phénobarbital ont déjà disparu sans qu'aucun spot métabolique révélable soit au réactif SO_4Hg - Diphénylcarbazone en C. C. M., soit à la chromatographie en phase gazeuse, ne se soit manifesté. Il faut donc admettre une dégradation immédiate de la molécule en ses éléments les plus simples : ammoniaque et urée.

- qu'à la dixième minute le pic n° 1 représente 10 p 100 du Phénobarbital mis en expérience. Or ce pic provient intégralement de l'ouverture du Phénobarbital non disparu à la cinquième minute, puisque la somme Pic n° 1 + Phénobarbital a la même valeur qu'à la cinquième minute.

- qu'à la trentième minute le pic n° 2 s'illustre pour une valeur de 4 p 100. Sa provenance directe ou indirecte par l'intermédiaire ou non du pic n° 1 coïncide avec une baisse en concentration du Phénobarbital.

- la somme des trois pics présente la même valeur qu'à la cinquième et à la dixième minute.

- qu'à la soixantième minute la concentration en produit correspondant au pic n° 2 est identique à celle existant à la trentième minute, mais que le pic n° 1 croît à un

pourcentage maximum de 35 p 100 nettement plus important que le Phénobarbital résiduel (10 p 100).

- enfin qu'à la quatrevingtdixième minute le Phénobarbital a disparu en presque totalité (2 p 100 seulement seront retrouvés), le produit correspondant au pic n° 1 a diminué de 11 p 100 en trente minutes et celui correspondant au pic n° 2 a subi seulement une faible diminution de concentration.

En résumé, en quatrevingtdix minutes, 98 p 100 du Phénobarbital ont été hydrolysés, 24 p 100 représentent le pic n° 1, 3 p 100 le pic n° 2. On peut dire que 71 p 100 du Phénobarbital ont été transformés en dérivés non méthylables et non décelables en chromatographie en phase gazeuse.

Le problème qui se pose maintenant est de déterminer quels sont, parmi les quatre spots retrouvés en chromatographie en couche mince, ceux qui se manifestent à la chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, comme nous l'avons précédemment indiqué, nous avons soumis chaque tranche séparée puis éluée au méthanol, à la chromatographie en phase gazeuse.

La première tranche (a) ainsi traitée correspond aux deux spots chromatographiques 0 et 0,04 qu'il est matériellement impossible de séparer.

La deuxième tranche (b) comporte la fraction de KIESELGEL prélevée au niveau du Rf 0,15.

La troisième (c) comporte les deux spots mélangés de Rf 0,45 et 0,75 correspondant au Phénobarbital et à son dérivé.

Les résultats obtenus sont mentionnés ci-dessous :

- la tranche (a) illustre les deux pics n° 1 et n° 2 obtenus dans nos chromatogrammes portant sur l'éluat total.
- la tranche (b) donne un chromatogramme strictement plat.
- la tranche (c) ne donne que le pic du Phénobarbital.

Tous les pics révélés présentant une hauteur importante à l'opposé de ce que nous constaterons avec certains des autres Barbituriques étudiés dans les mêmes conditions, ce qui correspond d'ailleurs à l'intensité des spots révélés en C. C. M.

Dans la zone (a) nous trouvons 2 pics correspondant aux 2 dérivés obtenus en C. C. M. et de Rf respectifs égaux à 0 et 0,04. D'après les formules antérieurement proposées pour les 2 produits correspondant à ces 2 spots il ressort qu'ils sont méthylables donc retrouvables en chromatographie en phase gazeuse.

C'est ce qui a lieu et qui confirme notre hypothèse c'est-à-dire que celui de Rf 0,04 est parfaitement compatible avec le produit résultant de la simple ouverture du cycle, étant donné le temps d'apparition primitif du pic n° 1 on doit lui attribuer la formule correspondant à la simple ouverture du noyau. Le pic n° 2 apparaissant ultérieurement ne peut être que le produit résultant de sa décarboxylation, ce qui est en accord avec les formules proposées antérieurement à l'occasion de l'étude en C. C. M.

Dans la zone (b) il n'est décelé aucun pic. Nous avons antérieurement affecté au pic de Rf 0,15 correspondant à cette zone la formule R_1,- R_2 - acétique non méthylable dans nos conditions expérimentales.

Dans la zone (c) nous ne trouvons que le pic du Phénobarbital. Le produit de Rf 0,75 possédant une fonction amide n'a pas été détecté.

* *

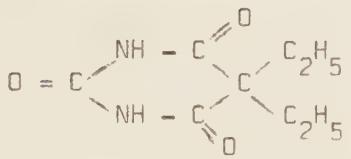
*

B A R B I T A L

Véronal

***

Rappel de la formule : Acide 5-5'-diéthyl malonylurée



1 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Détermination du Rf moyen :

Le Rf moyen obtenu à partir de 60 spots est de 0,48. La dispersion des résultats va de 0,44 à 0,52.

2 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Détermination du temps de rétention moyen :

Les résultats portent sur 35 chromatogrammes et les temps de rétention moyens du Barbital sont de :

- 635 secondes sur OV_{17}
- 430 secondes sur OV_{1}.

3 - HYDROLYSE

Le Barbital, comme le Phénobarbital, résiste très bien à l'hydrolyse alcaline.

Nous avons constaté :

- qu'il faut au moins 10 minutes pour que commence à se manifester, de façon fort discrète d'ailleurs, un seul dérivé d'hydrolyse,

- qu'entre 45 minutes et une heure, les divers produits de dégradation sont à une concentration optimum pour permettre au mieux leur étude,

- qu'après 2 heures il ne reste plus qu'une faible quantité de produit pur.

Les transformations pouvant intervenir sur la molécule de Barbital étant théoriquement superposables à celles mentionnées pour le Phénobarbital, nous renvoyons, pour leur illustration, au tableau correspondant à ce Barbiturique.

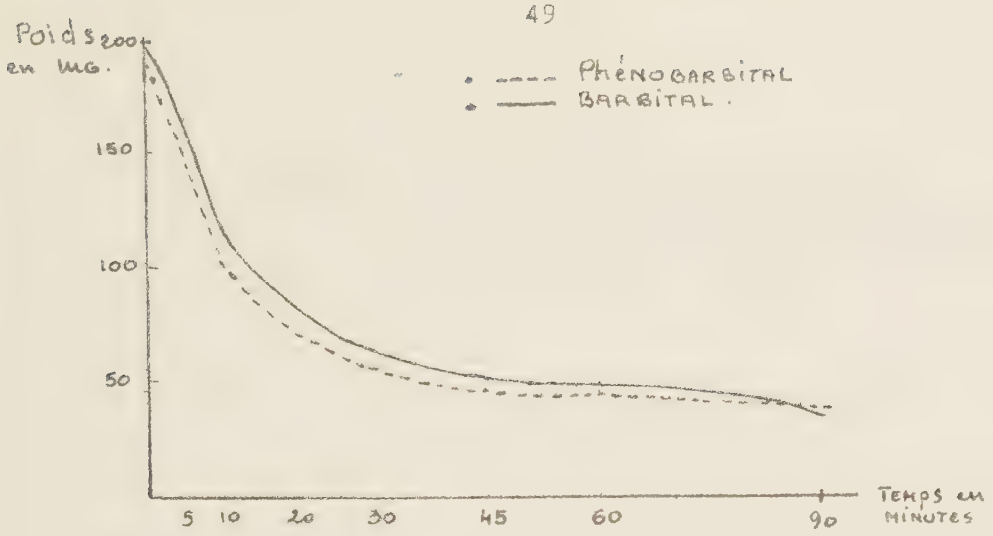
Signalons que, dès les premières minutes d'hydrolyse, nous avons également pu mettre en évidence l'ion ammonium.

4 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

ETUDE EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

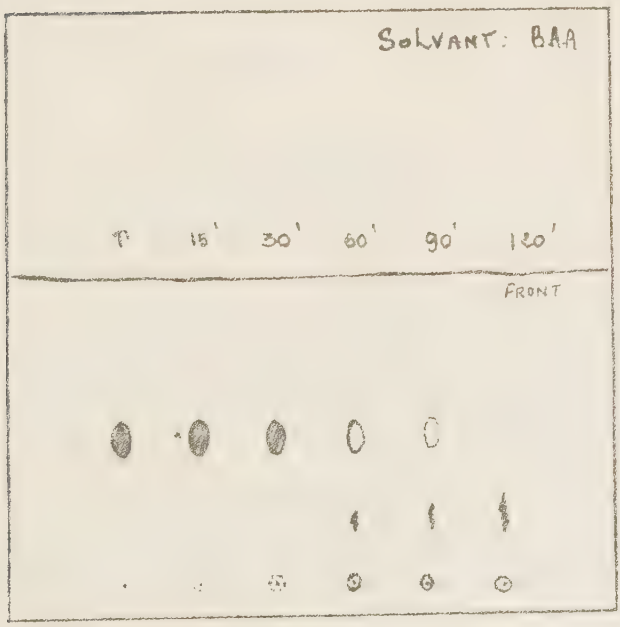
- Les poids des extractifs éthérés acides obtenus dans les mêmes conditions opératoires mentionnées pour le Phénobarbital aux différents temps d'hydrolyse sont illustrés par le tableau et la courbe suivants.

Temps d'hydrolyse	0	5 mn	10 mn	20 mn	30 mn	45 mn	1 h	1 h 30
Poids trouvé pour 200 mg	195	166	120	115	66	53	49	41
Rendement (en p 100)	97	83	60	57	33	26	24	20



Ces résultats montrent que la molécule du Barbital est dégradée pratiquement selon le même processus quantitatif que celle du Phénobarbital.

- Apparition des spots : révélation au sulfate mercurique et à la Diphénylcarbazone.



OBSERVATIONS :

- Pour un temps d'hydrolyse inférieur à 15 minutes on n'observe en pratique la formation d'aucun dérivé de dégradation en quantité notable,

- Après 30 minutes, à Rf très voisin de zéro, se manifeste un spot bleu très léger,

- Après 45 minutes, le spot correspondant au Barbital diminue d'intensité. Dans certains cas, il peut apparaître un spot violet coiffant le spot métabolique de Rf 0 ainsi qu'une trainée de Rf voisin de 0,20. De toute façon, ces spots sont excessivement discrets et n'ont rien de comparable en intensité à ceux obtenus dans les mêmes conditions opératoires avec le Phénobarbital,

- Après 1 heure, l'intensité du spot du Barbital a diminué sensiblement de moitié ; aucun autre nouveau spot ne se manifeste,

- Enfin, après 2 heures, le Barbital lui-même n'est plus détectable.

Ces différentes constatations sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Rf	Temps en minutes					
	15	30	45	60	90	120
0		±	±	±	±	0
0,20			±	±	±	0
Barbital 0,48	+++	+++	++	+	±	0

Remarques :

Il ressort de ces résultats que les dérivés d'hydrolyse du Barbital sont au nombre de trois mais chacun d'entre eux en quantité excessivement faible, les deux premiers ont des Rf identiques et de même allure que ceux du Phénobarbital. Par ailleurs, le Barbital disparaît très progressivement au fur et à mesure du temps d'hydrolyse, jusqu'à devenir indétectable à la deuxième heure. De ce fait nous sommes amenés à constater que, ou bien le Barbital se clive directement et intensément en urée et ammoniaque ou bien tous ses métabolites ont une instabilité excessivement importante vis-à-vis de la base.

ETUDE DE L'HYDROLYSAT D'UNE HEURE

Pour l'étude de ces métabolites nous avons choisi l'hydrolysat d'une heure car, à ce temps, nous nous trouvons dans les meilleures conditions pour mettre en évidence les produits de dégradation en présence de Barbital encore intact.

* Révélation au $HgSO_4$ et à la Diphénylcarbazone

Nous trouvons :

Rf = 0 un spot rond de couleur bleue.
Rf = 0,04 surmontant le précédent, un spot violet très discret.
Rf = 0,20 un spot en forme de traînée de faible coloration bleu
Rf = 0,48 le spot correspondant au Barbital intact.

* Révélation des fonctions organiques

Aucun des réactifs mis en oeuvre en vue de la détection des fonctions des métabolites n'a donné de résultat positif.

Nous n'avons pu, même après concentration, mettre en évidence ni des groupes acido-basiques, ni des groupes -NH-CO- ou réducteurs ; le seul spot absorbant en U. V. à 254 mμ étant celui correspondant au Barbital intact.

CONCLUSIONS

Des données antérieures il résulte qu'il est impossible de tenter d'affecter les produits théoriques de dégradation aux

différents spots expérimentaux retrouvés. Ces produits, difficilement détectables en C. C. M. vu leur faible concentration, ne se forment que transitoirement ou en faible quantité.

On peut donc admettre que le Barbital, soumis à l'hydrolyse alcaline au bain marie bouillant, se dégrade progressivement en CO_2 et NH_3.

Les spots de Rf 0 et occasionnellement de Rf 0,04 doivent correspondre, d'après les observations que nous aurons à mentionner lors de l'étude des autres Barbituriques, à l'ouverture du noyau et à la décarboxylation du dérivé précédent.

5 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons établi que le temps de rétention du Barbital était de 635 secondes pour une programmation de température de 70 à 210°. Mais nous avons pensé que la température de départ était trop élevée, car en principe, les produits de dégradation devraient, en fonction de leur poids moléculaire plus faible, sortir avant le produit intact. Nous avons donc modifié nos conditions opératoires et nous avons programmé la température de 50 à 200 °C.

Nous avons opéré, comme dans le cas du Phénobarbital, sur les extractifs provenant de l'hydrolyse arrêtée à des temps progressivement croissants. Le bloc de ces extractifs, après méthylation, a été chromatographié.

Quelle que soit la durée de l'hydrolyse il ne nous a pas été permis de mettre en évidence d'autre pic que celui du Barbital resté intact. L'aire de ce pic diminue en fonction du temps d'hydrolyse ; au bout de 2 heures le chromatogramme est plat.

Temps d'hydrolyse	0	10'	20'	30'	45'	1 h	2 h
% retrouvés	100	86	70	42	17,5	10	inf 1

Dans les cas les plus favorables, après une heure d'hydrolyse, nous avons tenté la séparation des spots obtenus et ceci par la C. C. M. selon la technique décrite précédemment dans les généralités.

Nous avons séparé la plaque en 2 zones :

- zone 1 : spots Rf 0 - 0,04 - 0,20
- zone 2 : spots Rf 0,48

Après élution et méthylation, la chromatographie n'a pas permis de mettre en évidence de pic dans la fraction 1. Le pic de Barbital a été retrouvé dans la fraction 2.

CONCLUSION :

Le Barbital se dégrade faiblement, les C. C. M. ont montré la faible intensité des spots obtenus.

Dans nos conditions expérimentales, soit le Barbital se transforme directement en ammoniaque et gaz carbonique, soit les produits intermédiaires de l'hydrolyse sont de stabilité peu importante et non décelables par nos techniques.

* *

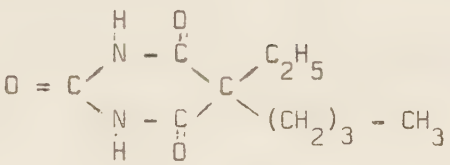
*

B U T O B A R B I T A L

Sonéryl

***

Rappel de la formule : Acide Ethyl-5-Butyl-5'-Malonylurée



1 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Détermination du Rf moyen :

Sur 55 spots le Rf moyen trouvé est de 0,74.

2 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Détermination du temps de rétention moyen :

Sur 25 chromatogrammes les temps de rétention moyens du Butobarbital sont de :

- 923 secondes sur OV_{17}
- 692 secondes sur OV_{1}

3 - HYDROLYSE

Nous sommes amené à faire les constatations suivantes :

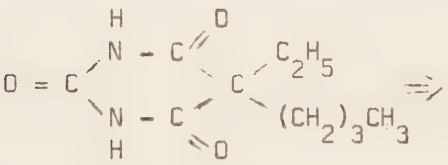
- un temps d'hydrolyse inférieur à 10 minutes est

insuffisant pour altérer la molécule,

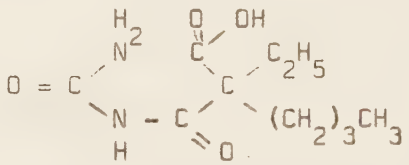
- ce n'est qu'après 45 minutes que nous pouvons visualiser, après C. C. M., au réactif SO_4Hg-Diphénylcarbazone, 4 spots de dégradation. Une quantité non négligeable de Butobarbital reste encore intacte.

- après 2 heures d'hydrolyse les spots diminuent d'intensité en fonction du temps et disparaissent au bout de 2 h 30.

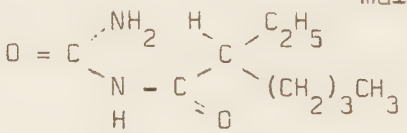
Avant d'exposer nos résultats expérimentaux, nous établirons préalablement, de façon théorique, les transformations pouvant intervenir sur la molécule de Butobarbital. (57)



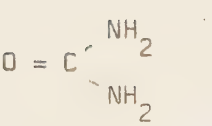
Ac. 5-éthyl-5'-butyl-malonylurée

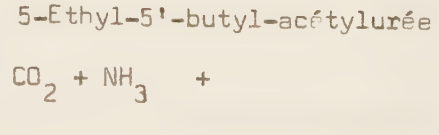


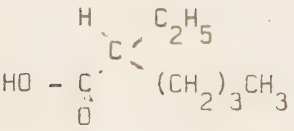
Ac. 5-éthyl-5'-butyl malonylurique



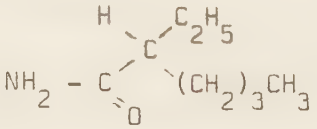
5-Ethyl-5'-butyl-acétylurée







Ac. 5-éthyl-5'-butyl-acétique



5-éthyl-5'-butyl-acétamide

Il est probable que la chaine butyle se maintient intacte jusqu'au stade final des transformations et qu'elle reste adhérente aux métabolites. On peut donc penser a priori que, le nombre de dérivés intermédiaires pouvant exister transitoirement lors de cette hydrolyse présentera un pa rallélisme avec celui obtenu lors de la dégradation du Phénobarbital.

Signalons que tout au long de nos expériences nous avons mis en évidence, comme dans les précédentes expériences, de l'ammoniaque et de l'urée en petite quantité.

4 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

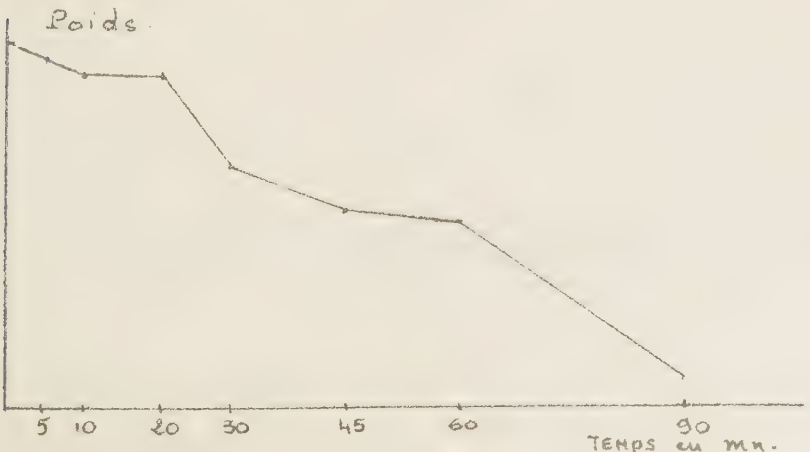
L'hydrolyse a été arrêtée aux temps suivants : 5, 10, 15, 30, 45 minutes, 1 heure et 1 heure 30. Les extractions ont été effectuées aux temps sus-mentionnés sur des échantillons de 20 ml d'un seul hydrolysat portant sur une solution étalon à 1 g pour 100 de Butobarbital.

ETUDE EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

- Les résidus secs pondéraux d'extraction éthérée se sont montrés être de plus en plus faibles ainsi que le mentionnent le tableau et le graphique suivants.

TEMPS (en mn)	0	5	10	15	30	45	60	90
POIDS (en mg)	192	183	182	182	126	105	100	15
RENDEMENT (en %)	96	91,2	91	91	63	50,2	50	0,07

Nous constatons que la vitesse de dégradation du Butobarbital est beaucoup moins accusée dans les premiers temps de l'hydrolyse que celle que nous avons observé avec le Phénobarbital et le Barbital.



- Apparition des spots : révélation au $HgSO_4$ et à la Diphénylcarbazone :

Rf \ Temps	0	5	10	15	30	45	1 h	1h30	Couleur
0	±	±	+	+	++	+++	+++	+++	bleu violet
0,08				±	+	++	++	++	violet
0,26						+	+	+	bleu
0,45			+	+	+	+	+	+	mauve
0,63			±	+	+	+	+	+	rose
0,74	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	violet mauve

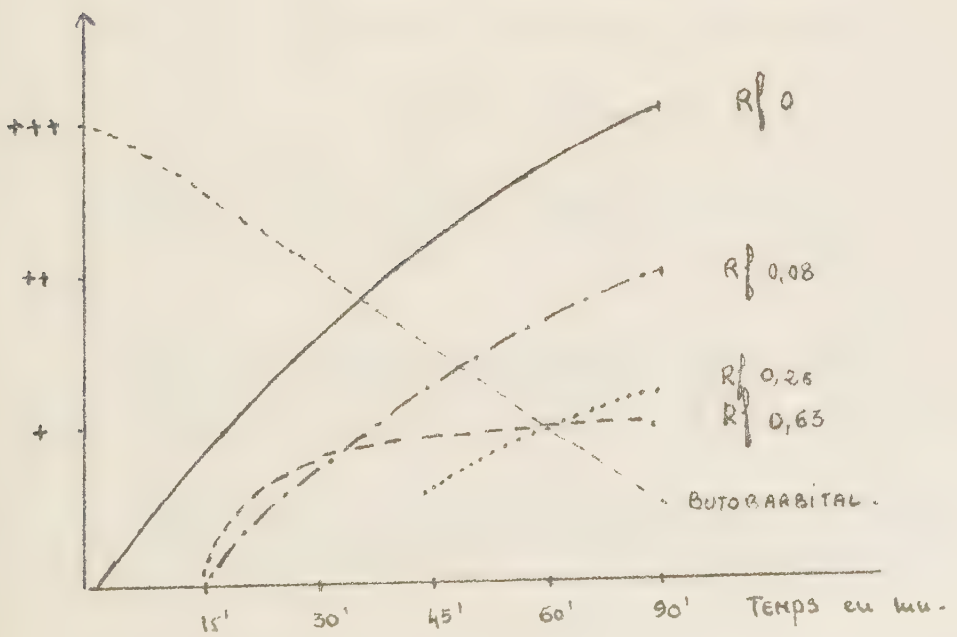
ETUDE D'UN HYDROLYSAT DE 45 MINUTES

* Révélation des spots au réactif SO_4Hg - Diphénylcarbazone

Ce réactif a permis de mettre en évidence :

- à Rf 0 un spot de coloration violette,
- à Rf 0,08 un spot en forme de flamme, de couleur mauve,
- à Rf 0,26 une traînée bleue,
- à Rf 0,45 un spot rond de couleur rose
- à Rf 0,63 un spot rose discret lequel est surmonté du spot de Butobarbital à Rf 0,74.

Ces différents spots n'apparaissent pas tous en même temps comme le montre le tableau précédent. Nous pouvons alors établir un graphique représentant l'existence et l'intensité de ces différents spots en fonction du temps d'hydrolyse.



* Révélation des fonctions organiques

- Détection des groupes acido-basiques

Nous avons ainsi mis en évidence pour les spots à

. Rf 0 de couleur rose
. Rf 0,08 de couleur jaune
. Rf 0,45 de couleur jaune
. Rf 0,63 de couleur jaune pâle
. Rf 0,74 de couleur jaune pâle

- Détection du groupe -NH

2 spots réagissent, ceux à

. Rf 0,08
. Rf 0,63

Dans certains cas, le spot à Rf 0,45 réagit faiblement avec le réactif.

- Détection du groupe -CO

Aucun spot n'a réagi avec ce réactif.

- Détection des groupes réducteurs

Les spots de Rf 0 et 0,8 sont très faiblement réducteurs. Le pouvoir réducteur se manifeste après passage à l'étuve seulement et toujours très discrètement.

- Mise en évidence des substances absorbant en U. V.

Seul le spot du Butobarbital (Rf 0,74) absorbe en U. V..

Le tableau ci-après résume l'ensemble de ces résultats.

Rf des spots	LEMAIRE-DIPHENYLCARBAZONE		UV	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	P.D.A.B.
	couleur	forme				
0	bleu violet	ronde	+ -	++	léger	
0,08	mauve	flamme	+ -	++	léger	+
0,26	bleu	traînée				
0,45	rose mauve	ronde		+		
0,60	rose	ronde		+ -		+
0,74	violet	ovale	++	+		

En résumé

Le spot de Rf 0 est acide et très faiblement réducteur.

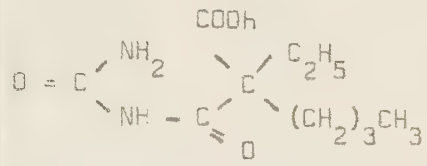
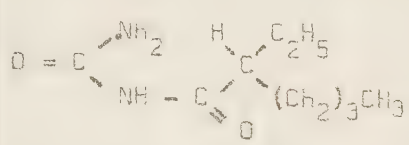
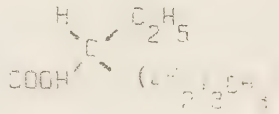
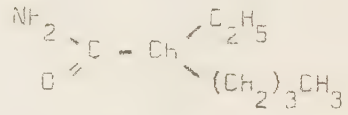
Le spot de Rf 0,08 très acide et très faiblement réducteur réagit au P. D. A. B.

Le spot de Rf 0,45 est légèrement acide.

Le spot de Rf 0,63 légèrement acide réagit au P. D. A. B.

Des résultats précédents il ressort que le nombre des métabolites détectés lors de l'hydrolyse du Butobarbital est plus élevé que dans le cas du Barbital mais du même ordre que dans le cas du Phénobarbital. Il nous apparaît donc que la chaîne butyle reste intacte et cela d'autant plus qu'au cours de l'opération aucune réaction d'oxydation n'est capable de se manifester.

Le tableau suivant établit une relation entre, d'une part les réactions analytiques théoriques et expérimentales et, d'autre part, les éventuels produits de dégradation.

FORMULES PROPOSEES	Produit identifié au spot de Rf	REACTIONS THEORIQUES	RESULTATS EXPERIMENTAUX
	0	Guillaumin ++ U. V. + $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. +	Guillaumin ++ U. V. ± $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. 0
	0,08	Guillaumin + U. V. + $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. +	Guillaumin + U. V. ± $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. +
	0,45	Guillaumin + U. V. 0 $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. 0	Guillaumin + U. V. 0 $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. 0
	0,63	Guillaumin ± U. V. 0 $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. +	Guillaumin ± U. V. 0 $KMnO_4$ 0 P. D. A. B. +

5 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les extractifs provenant de l'hydrolyse arrêtée à des temps progressivement croissants ont été chromatographiés dans les mêmes conditions que pour les autres Barbituriques.

APPARITION DES SPOTS EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

Nous avons pu observer :

- à froid : un pic à 923 sec. qui correspond au Butobarbital intact ainsi que 2 autres pics très discrets à 673 sec. et 1 152 sec.

- pour des temps d'hydrolyse de 5 et 10 minutes : les mêmes pics que précédemment, ceux à 673 et 1 152 sec. restent très petits.

- pour 20 minutes : il apparaît un petit pic à 388 sec., les pics à 673 et à 1 152 sec. restant inchangés tandis que le pic à 923 sec. diminue.

- pour 30 et 45 minutes : il n'apparaît aucun changement dans les chromatogrammes obtenus, seul le pic à 923 sec. continue de diminuer.

- pour 1 heure : tous les pics diminuent d'intensité.

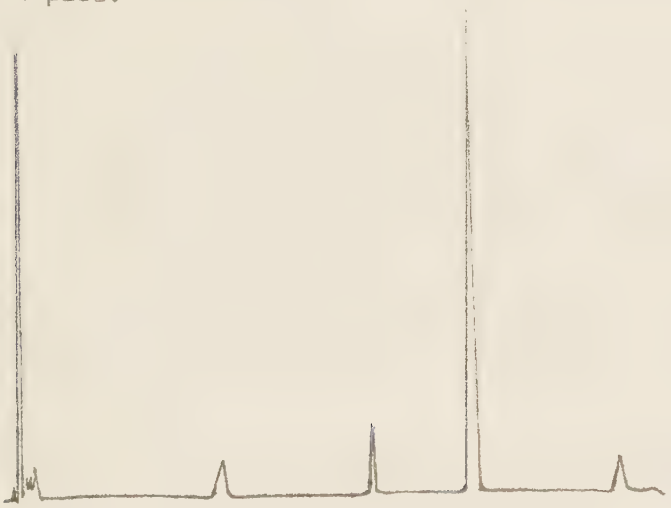
- à 1 heure 30 : il ne reste plus de Butobarbital ; les pics à 388 sec. et 673 sec. sont très faibles celui à 1 152 sec. a disparu.

Du point de vue quantitatif, l'étude en fonction du temps a permis de donner les résultats suivants quant à la disparition du Butobarbital. Les autres pics restent, pour des temps supérieurs à 20 minutes, à peu près constants.

TEMPS (mn)	0	5	20	30	45	60	90
BUTOBARBITAL	100	91	55	36	31	10	1

ETUDE D'UN HYDROLYSAT DE 45 MINUTES

Pour 45 minutes nous obtenons un chromatogramme présentant 4 pics.



Séparation en chromatographie en phase gazeuse des différents spots obtenus en C. C. M.

Le chromatogramme est découpé en 3 zones :

- la zone a correspondant aux spots de Rf 0 -0,08
- la zone b correspondant aux spots de Rf 0,26 - 0,40
- la zone c correspondant aux spots de Rf 0,63 - 0,74

Chaque fraction une fois éluée au méthanol est méthylée puis chromatographiée. Nous avons ainsi mis en évidence :

- dans la zone a : 2 pics à 388 et 673 secondes,
- dans la zone b : aucun pic
- dans la zone c : 1 pic à 923 secondes,
  1 pic à 1 152 secondes.

CONCLUSION

Tous les pics sauf celui du Butobarbital sont excessivement discrets comme ils le sont d'ailleurs sur les plaques de chromatographie en couche mince.

Dans la zone a nous trouvons deux pics correspondant indubitablement aux métabolites de Rf 0 et 0,08.

D'après les formules proposées lors de l'étude en C. C. M. ces deux métabolites sont méthylables donc en accord avec les deux formules proposées (correspondant à l'ouverture simple du noyau puis à la décarboxylation du dérivé primaire obtenu).

Dans la zone b il n'est décelé aucun pic. Nous avons antérieurement affecté au métabolite de Rf 0,45 inclus dans cette zone la formule R_1 - R_2 acétique non méthylable dans nos conditions opératoires.

Dans la zone c nous trouvons le pic du Butobarbital, également un second pic correspondant au spot de Rf 0,63 auquel nous avons attribué la fonction amide R_1 - R_2 acétique qui est en accord avec nos déductions théoriques antérieures.

* *

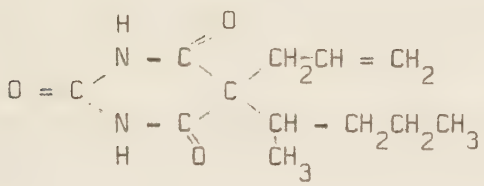
*

S E C O B A R B I T A L

Imménoctal

***

Rappel de la formule : Acide-5-allyl-5(1méthyl-butyl)-malonylurée



1 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Détermination du Rf moyen

Sur 95 spots, le Rf moyen trouvé est de 0,78 avec des variations allant de 0,75 à 0,80.

2 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Détermination du temps de rétention moyen

Sur 25 chromatogrammes les temps de rétention moyens du Sécobarbital sont de :

- 1 120 secondes sur OV_{17}
- 890 secondes sur OV_{1}.

3 - HYDROLYSE

Le Sécobarbital résiste énergiquement à l'hydrolyse. Nous avons

constaté que :

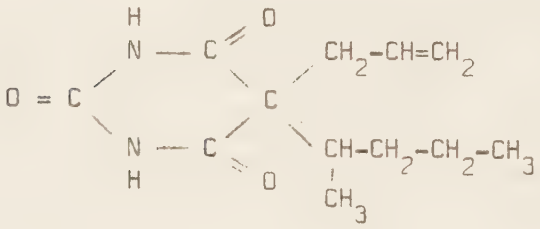
- un temps d'hydrolyse de 10 minutes est insuffisant pour altérer la molécule,

- au bout d'une heure nous visualisons seulement par le réactif sulfate mercurique - diphénylcarbazone, 5 spots de dégradation,

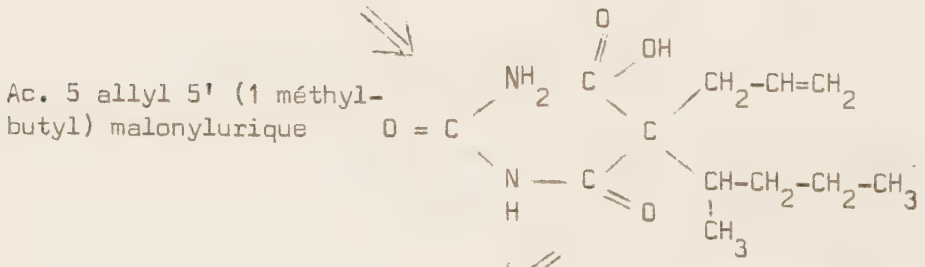
- au bout de 2 heures les différents spots sont encore présents.

Au cours de nos expériences, nous avons mis en évidence de l'ammoniaque et de l'urée mais en très faible quantité.

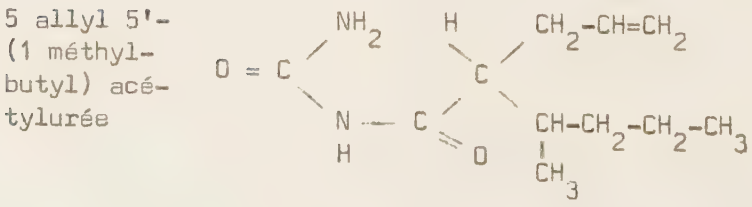
Avant de donner nos résultats expérimentaux, nous avons schématisé les transformations théoriques pouvant intervenir sur la molécule lors de cette hydrolyse alcaline.(57)



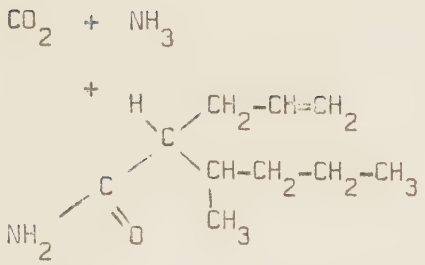
Ac. 5 allyl 5' (1 méthyl-butyl) malonylurée



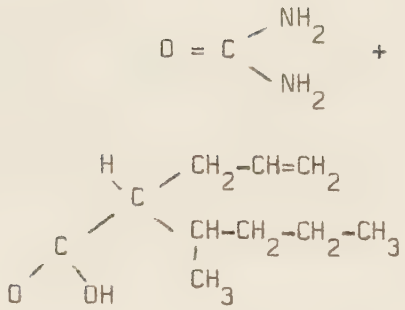
Ac. 5 allyl 5' (1 méthyl-butyl) malonylurique



5 allyl 5'-(1 méthyl-butyl) acétylurée



5 allyl 5' (1 méthyl butyl)-acétamide



Ac. 5 allyl 5' (1 méthyl butyl) acétique

Les transformations des deux chaînes allyl et butyl ne sont pas connues. La chaîne allyl peut se couper au niveau de la double liaison pour donner l'alcool correspondant CH_2 - CHOH -CH_3 ou à la rigueur la fonction cétone.

La chaîne butyle n'a aucune raison d'être hydrolytiquement transformée. Par ailleurs, ces chaînes ne peuvent que rester adhérentes au noyau.

4 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

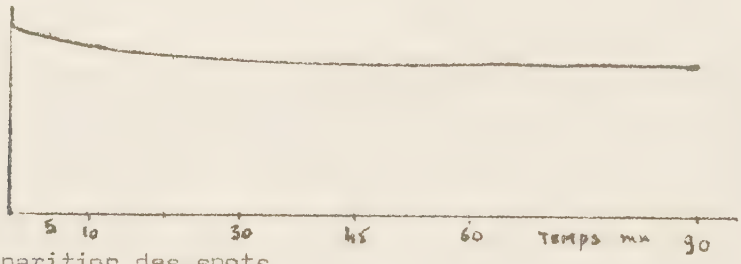
ETUDE EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

L'hydrolyse a été arrêtée aux temps suivants : 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 et 90 minutes. Les extractions ont été effectuées aux temps sus-mentionnés sur des échantillons de 20 ml d'un seul hydrolysat portant sur une solution étalon à 1 g pour 100 de Sécobarbital.

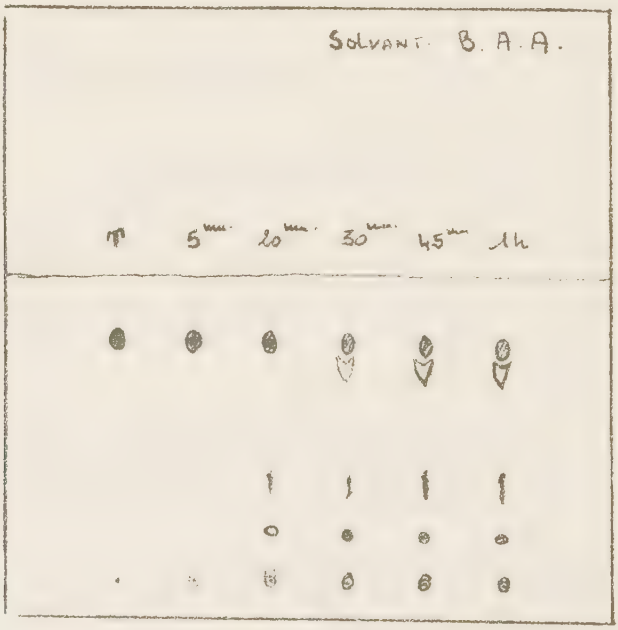
- Les résidus secs pondéraux d'extraction éthérée n'ont pas diminué comme dans le cas des autres Barbituriques. Nous avons observé qu'en fonction du temps les résidus présentent un aspect huileux.
Les résultats ont évolués suivant le tableau ci - après.

TEMPS (mn)	à froid	5	10	15	20	30	45	60	90
Poids trouvé pour 200 mg	199	199	197	195	189	189	185	184	181
POURCENTAGE	99,5	99,5	98	97,5	94,5	94,5	92,5	92	90,5

Ces résultats ne sont pas en faveur d'une transformation des radicaux.



- Apparition des spots



- Pour un temps d'hydrolyse inférieur à 5 minutes nous considérons que la molécule est quasiment intacte, mais il est intéressant de remarquer qu'aux Rf voisins de zéro se dessinent déjà, mais très discrètement, les 2 spots : bleu sur la ligne de départ et violet pâle qui lui est superposé.

- A 10 minutes s'illustrent 4 spots de Rf 0, 0,04 - 0,15 et une traînée culminant à 0,68.

- A 15 minutes, nous n'avons pas noté de différence avec les résultats obtenus lors du temps précédent.

- Pour 20 minutes d'hydrolyse les spots de Rf 0 - 0,04 et 0,15 s'intensifient et il se développe au-dessus de ce dernier spot une traînée bleue diffuse présentant son maximum d'intensité vers Rf 0,26.

- A 30 minutes, 5 spots sont parfaitement individualisés ; la traînée mentionnée antérieurement reste faible. Le cinquième et dernier spot emboîte la zone inférieure du spot du Sécobarbital.

- Pour 45 minutes ou 1 heure l'allure du chromatogramme n'a pas sensiblement varié. A ce stade nous obtenons les différents produits dans un rapport convenable pour permettre l'étude des fonctions organiques formées.

- Pour 1 heure 30, aucun autre spot n'apparaît ; on note simplement une diminution légère de ceux antérieurement formés.

L'ensemble de ces résultats est mentionné dans le tableau suivant

Rf \ Temps	5	10	30	1 h	1 h 30
0	±	+	++	++	+
0,04	±	+	++	++	+
0,15		traces	++	+	+
0,26			traces	traces	
0,68		traces	+	+	+
0,78	+++	+++	++	++	+

ETUDE DE L'HYDROLYSAT D'UNE HEURE

* Révélation au sulfate mercurique de LEMAIRE et à la diphénylcarbazone

Ce réactif a permis de mettre en évidence :

- à Rf 0 un spot bleu de forme ronde.
- à Rf 0,04 un spot violet pâle surmontant le précédent et à peine décollé du premier.
- à Rf 0,15 un spot bleu foncé bien individualisé mais qui n'apparaît qu'à la seconde pulvérisation du réactif mercurique.
- à Rf 0,26 une traînée bleue très mal définie qui apparaît en même temps que le spot sus-cité.
- à Rf 0,68 un spot de couleur mauve pâle de forme particulière.
- à Rf 0,78 le spot bleu intense du Sécobarbital intact.

Il faut noter que ce Barbiturique se maintient intact dans une large proportion même pour un temps d'hydrolyse très long de 2 h 30.

* Révélation des fonctions organiques

- Détection des groupes acido-basiques

Nous avons mis en évidence :

. Rf 0 coloration rose jaune
. Rf 0,04 coloration jaune
. Rf 0,68 coloration jaune pâle
. Rf 0,78 coloration jaune

- Détection du groupe NH

Deux spots se colorent en jaune vif, celui de Rf 0,04 ainsi que celui de Rf 0,68.

- Détection du groupe C = O

Aucun spot ne réagit avec le réactif ce qui semble démontrer l'absence totale de dégradation de la chaîne isobutyle au niveau du carbone tertiaire.

- Détection des groupes réducteurs

Quatre spots réduisent énergiquement le permanganate en milieu sulfurique. Ce sont ceux de Rf 0 - 0,04 - 0,68 et 0,78.

- Mise en évidence des substances absorbant en U. V.

Les spots de Rf 0 et 0,04 absorbent faiblement, tandis que le spot de Sécobarbital absorbe intensément.

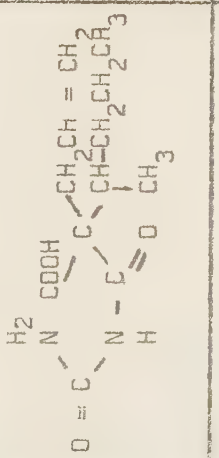
EN RESUME :

Les spots de Rf 0 et 0,04 sont acides, réducteurs et absorbent légèrement à 254 mμ.
Les spots de Rf 0,15 et 0,26 ne réagissent avec aucun réactif des des fonctions organiques.
Le spot de Rf 0,68 légèrement acide, réducteur vis-à-vis du $KMnO_4$ réagit au P. D. A. B.
Le spot de Rf 0,78 correspond au Sécobarbital.

L'ensemble de ces résultats est mentionné dans le tableau ci-après.

Rf des spots	LEMAIRE		U. V.	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	P.D.A.B.
	Couleur	Forme				
0	bleu	rond	±	+	+	
0,04	violet pâle	borde le 1er	±	±	+	±
0,15	bleu clair	rond				
0,68	mauve pâle			±	+	+
0,78	bleu		+	+	+	

La C. C. M. a permis de détecter 5 produits d'hydrolyse du Sécobarbital. Comme pour le Butobarbital, le nombre de produits mis en évidence n'est pas en faveur de la dégradation des chaînes allyl et méthyl - butyl et nous avons établi, en fonction des réactions analytiques mises en jeu, le tableau ci-dessous.

FORMULES	Rf	REACTIONS EXPERIMENTALES	REACTIONS THEORIQUES
	0	Guillaumin + U. V. ++ $KMnO_4$ + P.D.A.B. 0	Guillaumin ++ U. V. + + + + $KMnO_4$ + + + + P.D.A.B.
	0,04	Guillaumin + U. V. ++ $KMnO_4$ ++ P.D.A.B. ++	Guillaumin + + + + U. V. + + + + $KMnO_4$ + + + + P.D.A.B.
	0,68	Guillaumin + U. V. 0 $KMnO_4$ + P.D.A.B. +	Guillaumin + U. V. 0 $KMnO_4$ + + P.D.A.B. + +

5 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les conditions d'analyse sont les mêmes que pour les autres Barbituriques.

APPARITION DES PICS EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

A froid et pour tous les temps d'hydrolyse, même les plus courts, nous observons TROIS pics de temps de rétention : 1 120 secondes - 1 370 et 1 565 secondes.

De nombreuses expériences furent tentées pour essayer de rendre nos résultats quantitatifs mais nous n'avons pas pu leur donner de valeurs numériques. Nous avons pu cependant observer au fur et à mesure de l'hydrolyse :

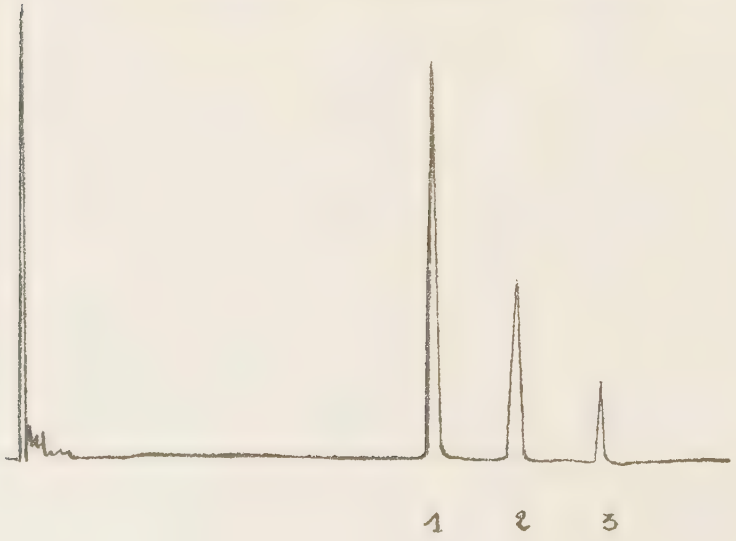
- une augmentation des pics 2 et 3 (le pic 2 étant toujours plus important que le pic 3),

- une diminution assez faible du pic 1.

Ceci ne nous permet pas d'avancer plus loin dans l'hypothèse selon laquelle les deux pics 2 et 3 se formeraient à partir du premier qui correspond au Secobarbital intact.

ETUDE D'UN HYDROLYSAT D'UNE HEURE

* Le chromatogramme obtenu est reproduit sur le graphique ci-dessous.



* Séparation en phase gazeuse des différents spots obtenus en C. C. M.

Le gel de silice est prélevé selon deux zones a et b :

- zone a : spots Rf 0 - 0,04 -
- zone b : spots Rf 0,15 - 0,26 - 0,68 - 0,78.

Chromatographie de la zone a : pas de pic

Chromatographie de la zone b : 1 pic à 1 120 secondes,
1 pic à 1 370 secondes,
1 pic à 1 565 secondes.

La chromatographie en phase gazeuse de la zone a n'a pas permis de séparer les 2 premiers spots de Rf 0 et 0,04 des autres spots. Dans nos conditions expérimentales ils n'ont pas été extraits ni méthylés, ce qui est en désaccord avec nos résultats précédents. Par contre, la chromatographie de la zone b, correspondant à 4 spots en C.C.M., p. rmet d'obtenir 3 pics bien que celui de temps de rétention de 1 565 secondes reste très faible tout au long de nos expériences.

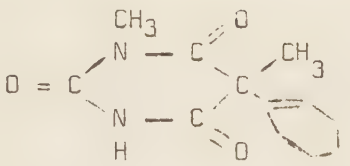
Dans le cas de ce Barbiturique il est difficile d'attribuer aux différents spots révélés en C.C.M. un pic qui lui corresponde en phase gazeuse.

* *
*

HEXOBARBITAL

* * *

Rappel de la formule : Acide 1-5-diméthyl-5'-1-cyclohexenyl-malonylurée



1 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Détermination du Rf moyen

Les résultats portent sur 90 spots d'Hexobarbital témoin. Le Rf moyen trouvé est de 0,86 avec des variations allant de 0,82 à 0,90.

2 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Détermination du temps de rétention moyen

Dans les conditions opératoires précédemment décrites, et sur 25 chromatogrammes, les temps de rétention moyens de l'Hexobarbital sont de :

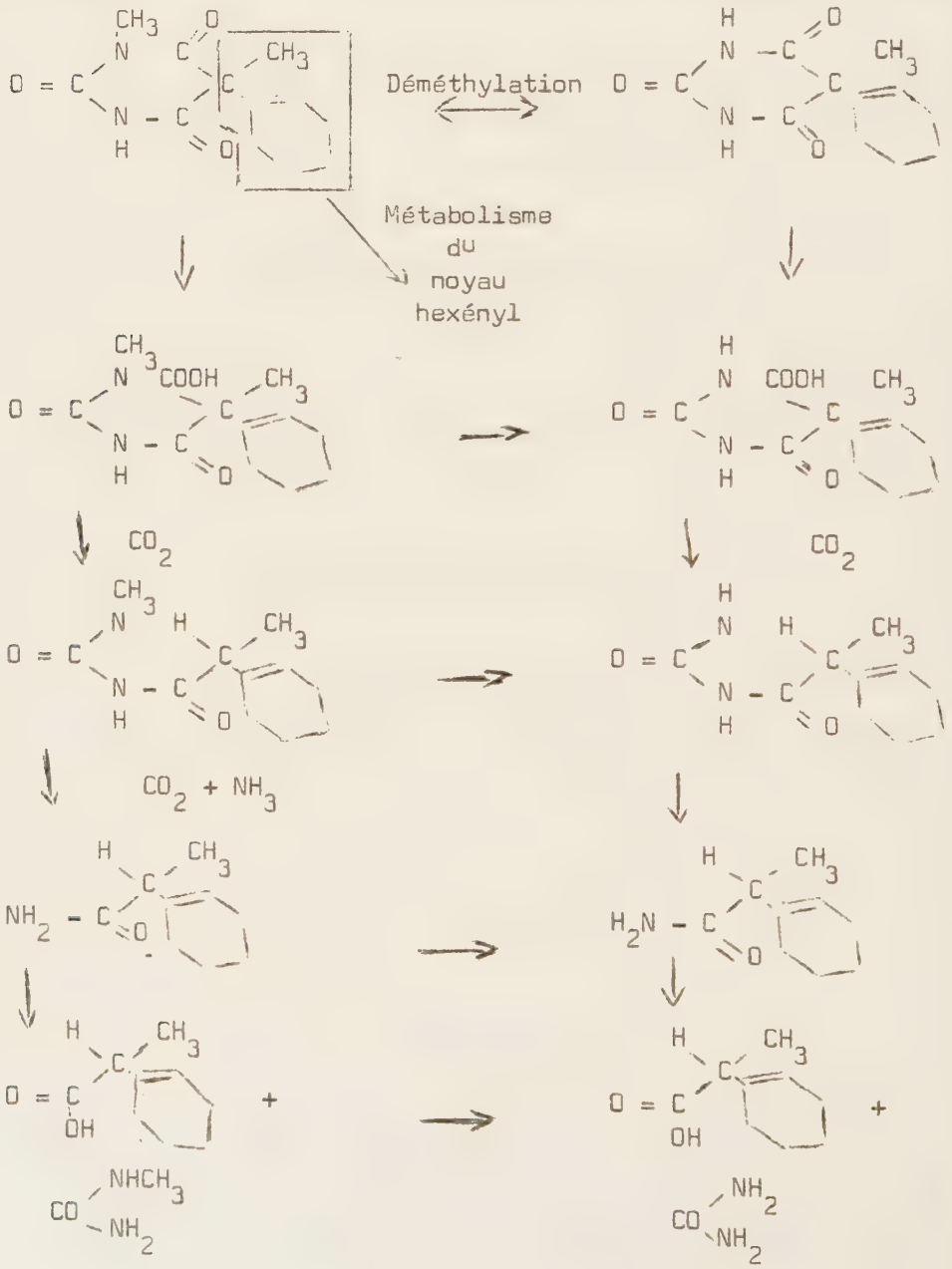
- 1 516 secondes sur OV_{17}
- 1 128 secondes sur OV_{1}.

3 - HYDROLYSE

La molécule est fragile et, à l'opposé de ce qui se passe pour le Barbital et le Phénobarbital, un temps d'hydrolyse de 10 minutes est largement suffisant pour obtenir des produits de dégradation tout en maintenant une partie non négligeable de l'Hexobarbital initial intact. Ce fait est d'ailleurs en accord avec la rapidité d'action du produit in vivo. Cette

rapidité d'hydrolyse est telle que l'on obtient déjà tous les produits de dégradation pour un temps très court de l'ordre de la minute.

Les transformations théoriques pouvant intervenir sur la molécule d'Hexobarbital sont résumées dans le tableau suivant.



La partie gauche du schéma précédent n'intéresse en fait que le noyau malonyl. Le radical N-méthyl peut se détacher et la chaîne cyclohexényl peut, soit se détacher, soit s'ouvrir à n'importe quel stade de l'hydrolyse. De ce fait, il est possible d'envisager un nombre très important de dérivés intermédiaires qu'il sera difficile d'identifier par nos techniques.

4 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

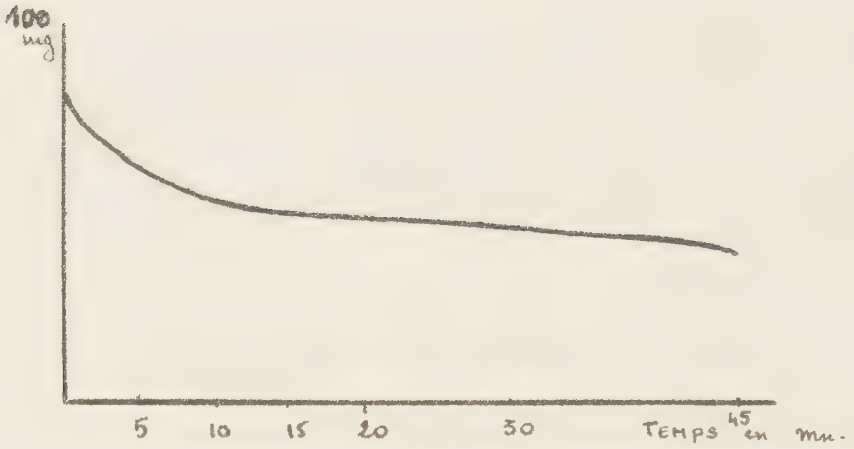
ETUDE EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

- Les résidus secs pondéraux d'extraction éthérée obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

TEMPS (en mn)	0	2	5	10	15	20	30	45
POIDS TROUVE (en mg pour 200 mg de produit)	82	72	64	54	52	50	49	40
RENDEMENT (en p 100)	41	36	32	27	26	25	25	20

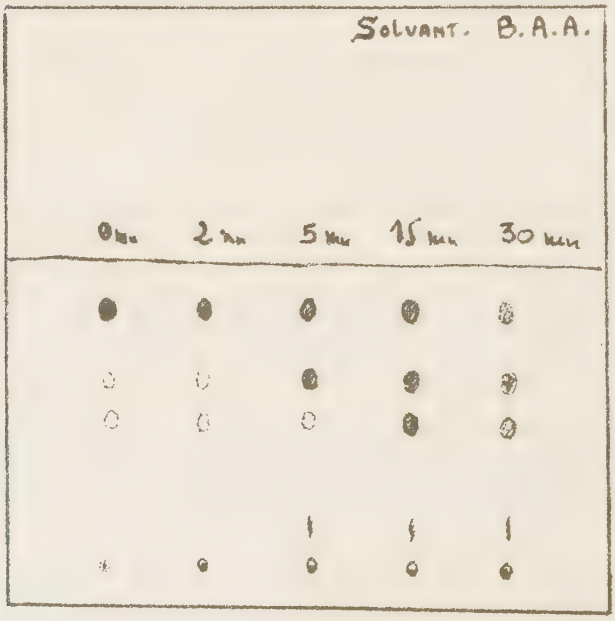
Les résultats signalés dans la colonne Temps 0 correspondent à un essai effectué sur le produit pur solubilisé à froid dans la solution alcaline et extemporanément extrait.

Les résultats sont illustrés dans le graphique suivant comparativement à ceux obtenus, dans les mêmes conditions opératoires, avec le Phénobarbital et le Barbital.



Ces graphiques mentionnent la perte très importante dans les 15 premières minutes en produits éthérosolubles, ceci comparativement au Phénobarbital et au Barbital.

- Apparition des spots



Rf / Temps	à froid	2'	10'	30'	45'
0	±	±	++	++	+
0,04		±	++	++	+
0,13			+	+	±
0,49	traces	±	+	+	±
0,66	traces	±	+	+	±
0,86	+++	+++	++	±	±

- A froid, le résidu sec de l'hydrolysat illustre au départ un spot circulaire violet bleu ainsi que des tâches très légères à Rf 0,49 et 0,66 ; le spot d'Hexobarbital se retrouve à Rf 0,86.

- A 2 minutes apparaît, accolé au spot de départ, un nouveau spot violet de Rf 0,04 tandis que les spots de Rf 0,49 et 0,66 s'accentuent.

- A 5 minutes, on observe toujours les 5 spots sus-cités ; une traînée bleutée diffuse commence à apparaître à Rf 0,13.

- A 10 minutes, le chromatogramme présente les 6 spots précédents bien nets et bien individualisés.

- A 15 minutes, tous les spots sont encore présents mais tandis que ceux correspondants aux produits de dégradation sont intenses, celui de l'Hexobarbital s'estompe.

- A partir de la vingtième minute, le spot d'Hexobarbital est presque inexistant, et de la trentième à la quarantième minutes, tous les spots décroissent en intensité pour disparaître totalement à la soixantième minute.

ETUDE DE L'HYDROLYSAT DE 10 MINUTES

* Révélation au sulfate mercurique et à la Diphénylcarbazone

Nous rappelons que ce réactif général a permis de mettre en évidence 6 substances. Sur la ligne de départ, nous trouvons un spot mauve qui ne décolle pas, surmonté d'un autre spot en accent circonflexe de coloration violette et de Rf 0,04.

Au Rf 0,13 apparaît une tâche bleutée puis un spot mauve de Rf 0,49 qui s'atténue en séchant.

Enfin, nous révélons 2 autres spots, un de Rf 0,66 de couleur rose, l'autre de teinte violet rose de Rf 0,86 correspondant au Barbiturique intact.

Lors de certaines chromatographies nous avons pu voir une tache rose très pâle, presque au front du solvant (Rf0,96) mais ceci de façon inconstante.

* Révélation des fonctions organiques

- Détection des groupes acido-basiques :

Nous avons mis en évidence 3 spots à réaction acide :

. celui de départ et celui de Rf 0,04, tous deux à acidité importante,

. celui de Rf 0,66 teinté en jaune pâle objectivant une faible réaction acide,

. celui de Rf 0,86 (Hexobarbital) est lui aussi très légèrement acide.

- Détection du groupe -NH

Le spot de Rf 0,13 réagit directement ; celui de Rf 0,66 se colore en jaune seulement après passage à l'étuve à 80 °C.

Rf des spots	LEMAIRE			GUILLAUMIN	P.D.A.B.	$KMnO_4$	U.V.
	forme	intensité	couleur				
0	ronde	+++	violet	++		++	+
0,04	accent circonflaxe	+++	mauve	+++	+	++	$\frac{+}{-}$
0,13	allongée	+	bleu				
0,49	rond	+	mauve	$\frac{+}{-}$			
0,66	rond	+	rose	+	+	++	
0,86	rond	++	violet	+		++	++

- REVELATION DES FONCTIONS ORGANIQUES -

- Détection du groupe -C=O

Il ne nous a pas été permis de détecter un groupement carbonylé. La chaîne hexenyl ne livre donc pas par voie hydrolytique de fonction cétone.

- Détection des groupes réducteurs au Permanganate de K en milieu sulfurique

Quatre spots présentent des propriétés vis-à-vis du réactif :

. celui de Rf 0
. celui de Rf 0,49
. celui de Rf 0,66
. celui de Rf 0,86 (Hexobarbital).

- Détection des substances absorbant en U. V.

L'examen aux U. V. à 254 mμ illustre 2 spots bruns, celui de départ et celui de l'Hexobarbital.

Il nous apparaît ici arbitraire d'essayer logiquement d'attribuer, comme nous l'avons fait antérieurement pour les autres Barbituriques, une formule à un spot.

Nous avons vu le nombre considérable de métabolites "théoriques" possibles du fait de la déméthylation ou de l'ouverture du cycle hexenique. Or, nous n'avons expérimentalement obtenu que 5 produits de transformation.

Le seul point sur lequel nous pouvons attirer l'attention réside dans l'obtention des spots 0 et 0,04 rigoureusement identiques à ceux déjà décelés et que nous avons considéré comme résultant de l'ouverture du noyau avec ou non décarboxylation.

Dans le tableau suivant nous avons confronté les résultats théoriques avec ceux obtenus sur les différents spots métaboliques. De ce fait, nous affectons les formules correspondantes aux différents spots mis en évidence.

FORMULES	Rf	REACTIONS EXPERIMENTALES		REACTIONS THEORIQUES	
	0	Guillaumin	++	Guil aumin	+
		P.D.A.B.	0	P.D.A.B.	0
		$KMnO_4$	++	$KMnO_4$	++
		U. V.	+	U. V.	+
	0,04	Guillaumin	+++	Guillaumin	+++
		P.D.A.B.	+	P.D.A.B.	+-
		$KMnO_4$	++	$KMnO_4$	++
		U. V.	+-	U. V.	0
	0,49	Guillaumin	+-	Guillaumin	++
		P.D.A.B.	0	P.D.A.B.	0
		$KMnO_4$	0	$KMnO_4$	++
		U. V.	0	U. V.	0
	0,66	Guillaumin	+	Guillaumin	0
		P.D.A.B.	+	P.D.A.B.	+-
		$KMnO_4$	+	$KMnO_4$	++
		U. V.	0	U. V.	0

5 - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

APPARITION DES PICS EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

* Une hydrolyse de 2 minutes permet de mettre en évidence :

  - un pic très petit de temps de rétention : 253 sec.
  - un pic plus important de temps de rétention : 887 sec.
  - l'Hexobarbital intact à 1 516 sec.

* Pour une hydrolyse de 5, 10 ou 20 minutes :

  Les pics à 253 et 887 secondes grandissent tandis que l'Hexo diminue, le pic à 887 secondes étant toujours plus important que le pic à 253 secondes.

* Après 20 minutes d'hydrolyse :

  Le pic d'Hexobarbital est très discret.

* Pour une hydrolyse supérieure à 25 minutes :

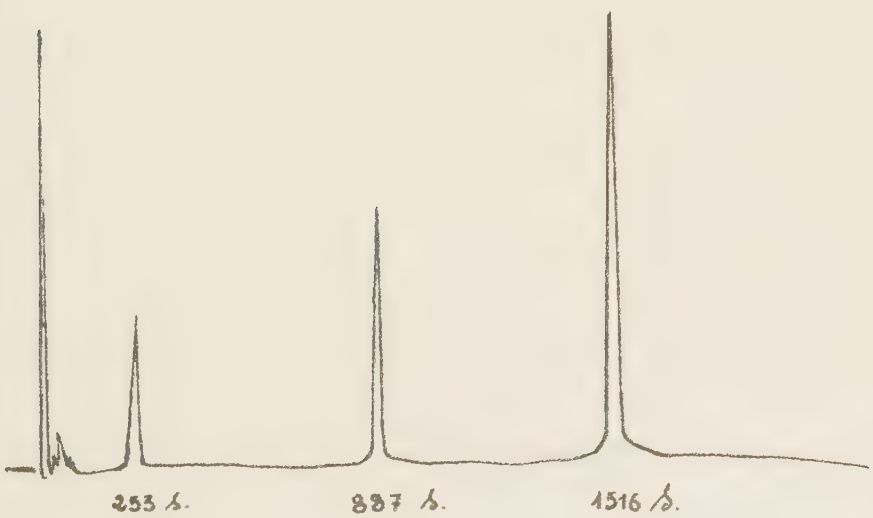
  Nous n'obtenons que les deux premiers pics. Parmi tous les spots illustrés en C. C. M. il n'existe, à tous les temps d'hydrolyse, uniquement que 2 dérivés méthylables.

Du point de vue quantitatif, nous pouvons apporter les précisions mentionnées dans le tableau suivant.

TEMPS (mn) / Pics	A FROID	2	5	10	15	20	30	45
253 sec.		0,10	0,16	3,9	4,9	5,7	6,4	7,8
887 sec.		0,5	6,1	6,6	10	11	11	9,8
1 516 sec.	100	73,5	52,3	12,6	7	1,6	0,7	-
TOTAL p 100	100	74,1	59,56	23,1	21,9	18,3	18,8	17,1

ETUDE DE L'HYDROLYSAT DE 10 MINUTES

* Le chromatogramme



* Séparation en chromatographie en phase gazeuse des différents spots obtenus en chromatographie en couche mince

Le gel de silice a été prélevé dans 3 zones a - b - c :

- zone a : spots de Rf 0 - 0,04 - 0,13
- zone b : spots de Rf 0,49
- zone c : spots de Rf 0,66 - 0,86.

Dans la zone a nous retrouvons les 2 pics à 253 et 887 secondes. A ces 2 spots doivent correspondre les formules émises antérieurement pour le Phénobarbital.

Dans la zone b il n'existe aucun pic. On a attribué au produit correspondant la formule du dérivé R_1 - R_2 - acétique. La chromatographie en phase gazeuse confirme cette hypothèse.

Dans la zone c seul l'Hexobarbital est identifié, donc le spot de Rf 0,66 n'est pas mis en évidence bien qu'il possède selon notre hypothèse une fonction amide.

* *

*

SECONDE

PARTIE

PHENOBARBITAL

***

Nos expériences ont porté dans le temps sur les urines de 4 rats soumis à une intoxication aiguë.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Dose administrée :

Des essais successifs nous ont permis de déterminer la dose provoquant un coma carus de 18 heures sans décès. Nous avons administré la dose de 285 mg par Kg, ce qui représente 60 mg pour chaque animal d'un poids moyen de 210 g.

Voie d'administration : par sondage oesophagien d'une solution aqueuse tamponnée à pH 8.

Maintien des animaux :

Les animaux ont été maintenus dans des cages à métabolisme et la récolte des urines a été effectuée toutes les 24 heures. Le coma carus de 18 heures minimum a été observé chez tous les animaux.

Volumes d'urines recueillis :

Jour d'élimination	1 j	2 j	3 j	4 j 5 j	6 j	7 j
Volume moyen éliminé en ml pour un rat	10	22	15	7,3	6	5

Nous avons volontairement arrêté nos expériences au 7ème jour car des dosages ont montré qu'après cette période les animaux n'éliminaient plus de barbiturique ni de molécules à réaction barbiturique. Nous avons cependant maintenu nos animaux dans les conditions sus-citées pendant 12 jours afin de constater qu'aucun n'est décédé.

Traitement des urines : afin d'obtenir une valeur moyenne les quatre échantillons d'urines quotidiennes ont été mélangés et soumis à l'extraction éthérée en milieu acide.

L'extractif éthéré, après dessication sur du Na_2SO_4 anhydre, a été évaporé à sec au bain-marie en trois parties aliquotes.

Nous signalons que l'éther-acide n'a pas été, préalablement avant son évaporation, lavé à la solution tampon à pH 7,6 car des essais multiples effectués à plusieurs reprises sur des urines de rats normaux n'ont jamais mis en évidence lors de la chromatographie en couche mince de spots révélables avec la diphénylcarbazone. De ce fait les métabolites possibles du Phénobarbital à fonction acide plus marquée que celle de la molécule intacte ne sont pas éliminés systématiquement par ce lavage et peuvent être détectés ultérieurement.

Les pesées des résidus d'extraction éthérés ont été effectuées chaque jour, mais les résultats numériques sont erronés de par le fait que l'éther entraine plus ou moins d'autres substances que les barbituriques.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Nous avons opéré selon la méthode générale, le résidu d'extraction est repris par 0,5 ml d'éthanol pur, les dépots sont de 15 µl.

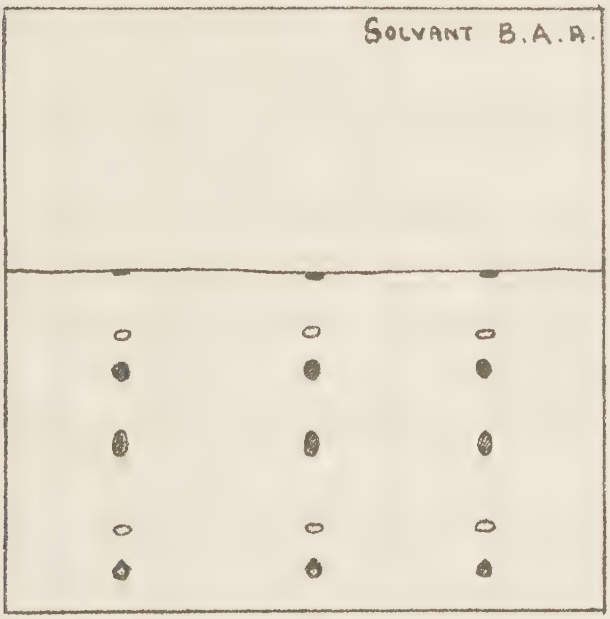
1°- Révélation au SO_4Hg et à la Diphénylcarbazone :

Les chromatographies en couche mince pratiquées pour tous les extractifs de chaque jour nous ont amené à dégager les remarques suivantes :

- à partir du 7ème jour il ne reste que de faibles traces de Phénobarbital intact à peine perceptible en chromatographie en couche mince.

- pour chaque urine des 6 premiers jours d'élimination nous revélons 7 spots lesquels auront des intensités de coloration variables en fonction du jour d'élimination.

- Schéma d'un chromatogramme type 3ème jour



La chromatographie en couche mince des urines du 3ème jour nous permet d'observer :

- au départ un spot bleu violet assez foncé qui ne décolle pas de la ligne de départ. Il est surmonté d'un halo violet dont le Rf est estimé à 0,04.

- viennent ensuite à :

  . Rf 0,15 un spot violet qui apparait après la deuxième pulvérisation de réactif, elle est fugace et s'estompe rapidement,
  . Rf 0,43 le spot violet de Gardénal,
  . Rf 0,67 un spot mauve de forme arrondie,
  . Rf 0,80 un spot violet qui peut sur certains chromatogrammes se trouver dédoublé en 2 spots aplatis à Rf 0,75 de couleur bleue et à Rf 0,84 de couleur mauve rose.

Le tableau suivant montre l'existence et l'importance des spots les uns par rapport aux autres, aux différents jours d'élimination.

Rf	Couleur	1 j	2 j	3 j	4-5 j	6 j	7 j
0	Bleu	+	++	++	++	+	+
0,04	Violet-Bleu	+	++	++	++	+	+
0,43	Violet-Bleu	+++	+++	++	++	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$
0,67	Mauve	+++	+++	++	++	+	+
0,80	Violet	+	++	++	++	+	+
au front	Bleu vif	+	+	+	+	+	+

2° - Révélation des fonctions organiques :

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

Rf	Lemaire	Guillaumin	$KMnO_4$	PDAB	U.V.
0	Bleu	++	++	Rose	+
0,04	Violet	+	+	Jaune	+
0,15	Violet		Léger	Rose pale	±
0,43	Violet Bleu		++	Très léger	+
0,67	Mauve	±	+	Rose	+
0,75		±	+		
0,84		±			
Front	Bleu	++	+		±

Remarque : Le spot de Rf 0,04 en forme de flamme présente à l'examen aux UV, 2 taches d'absorption distinctes l'une au-dessus de l'autre, taches qui apparaissent aussi lors de la révélation par le réactif de Guillaumin et qui présentent des pouvoirs réducteurs distincts vis-à-vis du $KMnO_4$ en milieu sulfurique.

CONCLUSION :

Il ressort des résultats obtenus que le rat excrète 4 produits de métabolisme : l'un à Rf 0,67 est assez important, les autres étant présents mais en très faible concentration.

Il est difficile d'établir des correspondances entre les spots obtenus après hydrolyse et ceux que l'on met en évidence dans les urines des rats traités par ce même barbiturique. Il n'est pas certain que le métabolisme biologique suive les mêmes voies que les réactions d'hydrolyse chimique.

Chez l'homme le Phénobarbital est excrété intact dans une proportion variant entre 20 et 25 p. 100 de la dose ingérée alors que chez le rat on estime que 10 p. 100 seulement sont éliminés en nature. (3) (12) (17) (21)

Le principal métabolite l'acide 5 éthyl 5 p. hydroxy phényl barbiturique (3) (4) (12) serait excrété, chez l'homme comme chez le rat, dans une proportion de 10 à 30 p. 100 de la dose de départ.

BUTLER (4) a montré par hydrolyse acide des urines qu'il est en grande partie conjugué chez le chien sous forme de glucuronate tandis que chez l'homme il ne serait que partiellement conjugué probablement sous forme de sulfate.

Nous avons pratiqué dans nos expériences sur les urines de rats une hydrolyse chlorhydrique afin de libérer les produits conjugués, nous n'avons pas pu constater de modifications dans nos résultats. La libération de glucuronoconjugués par la glucuronidase n'a pas apporté de meilleurs résultats.

A la suite de cette étude en chromatographie en couche mince nous pouvons résumer ainsi nos résultats :

- nous négligeons de parler du spot de Rf 0,43 qui correspond au Phénobarbital resté intact et que l'on retrouve avec plus ou moins d'intensité tout au long de nos expériences.

- trois spots de Rf 0 - 0,04 - 0,67 absorbent manifestement en U.V.

- les spots de Rf 0 - 0,04 - 0,67 - 0,80 présentent une acidité décelable au réactif de Guillaumin.

- enfin le spot de Rf 0,67 réagit avec le PDAB.

Grâce à ces trois réactions nous pouvons penser que ces 4 substances migrant à des Rf 0 - 0,04 - 0,67 - 0,80 présentent des hydrogènes labiles méthylables par le sulfate de diméthyle.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les échantillons d'urines de chaque jour ont été méthylés selon la technique générale page 13

Après évaporation sous azote de l'hexane le résidu est repris par 0,2 ml de sulfure de carbone.

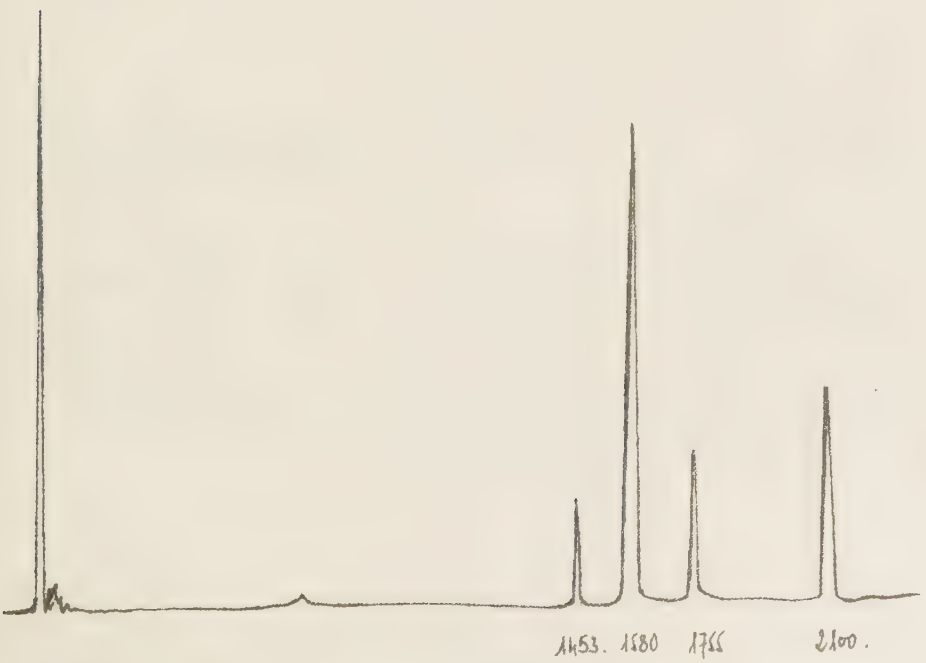
Les solutions sont chromatographiées dans les mêmes conditions sur 2 colonnes différentes : OV_{17} et OV_{1}.

Les injections sont de 1 µl pour une atténuation de 10 x 8.

A - UTILISATION DE LA COLONNE OV_{17}

1° - Apparition des pics

Quel que soit le jour considéré nous obtenons 4 pics principaux et constants dont les surfaces sont variables et qui occupent des proportions différentes les uns par rapport aux autres en fonction du jour d'élimination.



Les 4 pics principaux ont pour temps de rétention moyens :

pic N° 1 = 1453 sec. - pic N° 2 = 1580 sec. -

pic N° 3 = 1755 sec. - pic N° 4 = 2100 sec.

- au premier jour d'élimination, le chromatogramme obtenu nous permet de mettre en évidence 5 pics ayant pour temps de rétention : 770 sec.- 1453 sec.- 1580 sec. - 1755 sec. - 2100 sec.

Du point de vue quantitatif nous avons chiffré les surfaces des pics. Les valeurs numériques données représentent l'importance relative de chacun des pics par rapport à celui donné par le Phénobarbital (temps de rétention : 1580 sec.) éliminé en nature au premier jour. Nous lui avons attribué arbitrairement la valeur 1 soit en pourcentage la valeur 100.

Ainsi le pic de temps de rétention 770 sec. représente 3,5 p.100
le pic de temps de rétention 1453 sec. représente 2,6 p.100
le pic de temps de rétention 1755 sec. représente 4 p.100
le pic de temps de rétention 2100 sec. représente 9,5 p.100

- au deuxième jour d'élimination, nous notons la présence des 5 pics précédents auxquels nous pouvons donner les valeurs numériques suivantes :

le pic à 770 sec. représente 1 p.100
le pic à 1453 sec.représente 4,1 p.100
le pic à 1580 sec.représente 78 p.100
le pic à 1755 sec.représente 7,7 p.100
le pic à 2100 sec.représente 26 p.100

Nous constatons que tous les pics de dégradation augmentent à l'exception du pic à 770 sec. qui diminue de plus du tiers par rapport au premier jour.

- au troisième jour d'élimination, le chromatogramme comporte 4 pics, en effet le premier pic à 770 n'apparait plus.

Pour les 4 autres pics il faut noter que seuls les pics à 1453 sec. et 1755 sec. grandissent par rapport au pic de référence choisi et que leurs surfaces passent par un maximum. Le pic à 2100 sec. a déjà diminué d'intensité.

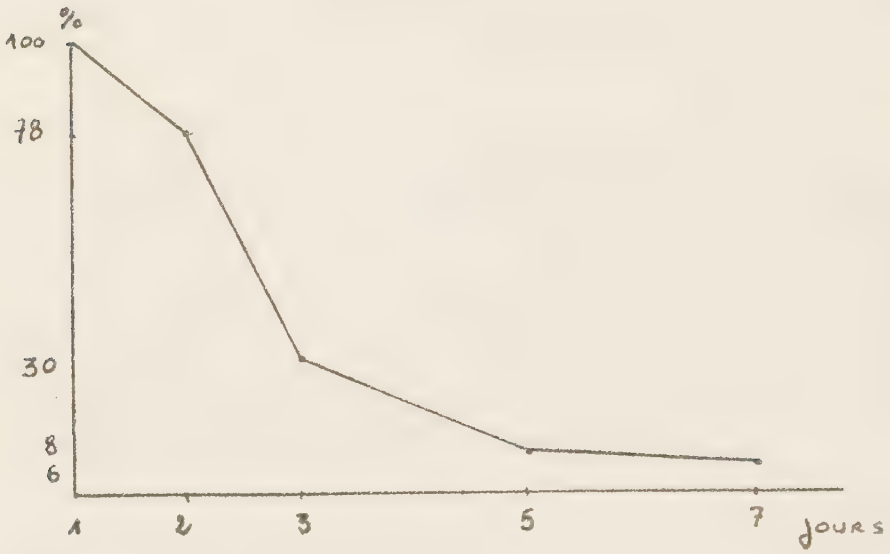
- au cinquième jour d'élimination, tous les pics diminuent mais se trouvent dans une proportion convenable. Nous nous servirons plus spécialement des urines du cinquième jour pour tenter la séparation des différents métabolites.

Jours d'élimination / Temps de rétention	1 j	2 j	3 j	5 j	7 j
770 sec.	0,035	0,01			
1453 sec.	0,025	0,041	0,042	0,027	0,10
1580 sec.	1	0,78	0,30	0,08	0,06
1755 sec.	0,040	0,077	0,096	0,066	0,004
2100 sec.	0,095	0,26	0,10	0,067	0,032

Remarque : Elimination du Phénobarbital.

Le graphique montre que l'élimination du Phénobarbital est très rapide puisque du premier au 3ème jour les pics passent de 100 p 100 à 30 p 100 pour atteindre 8 p 100 au 5ème jour et 6 p 100 le 7ème jour.

Nous avons poursuivi nos expériences au-delà du 7ème jour mais il ne reste plus de produit et nos chromatogrammes sont plats.



2°- Séparation des pics

Comme dans le chapitre précédent des métabolites chimiques nous nous sommes attaché à établir une correspondance entre les spots révélés par chromatographie en couche mince par le réactif sulfate mercurique et diphénylcarbazone et les pics obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

Dans ce but nous avons pratiqué une chromatographie en couche mince du résidu sec éthéré des urines de rats. Une fois révélé par le réactif sulfate mercurique-diphénylcarbazone, le chromatogramme a été découpé en 2 zones A et B.

Chaque zone a été prélevée et le gel de silice recueilli a été élué par le méthanol. Les résidus secs d'évaporation des solutions alcooliques ont été méthylés puis chromatographiés en phase gazeuse.

- la chromatographie en phase gazeuse de la zone A correspondant aux spots en chromatographie en couche mince de Rf 0-0,04 - 0,15 révèle deux pics : celui de temps de rétention de 1453 sec. et celui de 1755 sec.

- La chromatographie en phase gazeuse de la zone B correspondant aux spots de Rf 0,43 - 0,67 - 0,80 révèle deux autres pics : celui de temps de rétention de 1580 sec. et celui de 2100 sec.

Comment pouvons-nous interpréter ces résultats ?

- dans la zone A sur les 3 spots prélevés seuls les deux premiers peuvent quantitativement passer en chromatographie en phase gazeuse. En effet le spot de Rf 0,15 est très discret et sa récupération dans l'éluat alcoolique parait improbable.

Il est raisonnable de penser que les 2 pics obtenus correspondent aux 2 spots de Rf 0 et 0,4 mais il est délicat de leur attribuer un pic en particulier car ils se forment en même temps et sont présents tous les deux dans les premiers jours d'élimination.

- dans la zone B nous connaissons déjà le pic 1580 sec. qui correspond au Phénobarbital intact, mais quel est celui des deux spots de Rf 0,67 ou 0,80 qui passe à la chromatographie en phase gazeuse ?

Nous avons vu par l'étude des réactions analytiques des spots que tous deux ont de bonnes raisons d'être méthylables et nous ne pouvons affirmer que le pic à 2100 sec. correspond au spot de 0,67 plutôt qu'à celui de 0,80.

B - UTILISATION DE LA COLONNE OV_1

Nous avons pensé que cette colonne d'une polarité plus importante pouvait nous permettre une meilleure séparation des produits de dégradation du Phénobarbital. Mais hélas aucun autre pic ne fut mis en évidence lors de nos différents essais.

Nous avons toutefois remarqué que pour les mêmes conditions expérimentales les temps de rétention sont plus courts ce qui diminue le temps total d'analyse en cas d'urgence.

Pour chaque urine le chromatogramme présente 4 pics qui ont respectivement pour temps de rétention les valeurs suivantes : 1160 sec. - 1370 sec. - 1600 sec. - 1690 sec.

Les constatations que nous avons pu faire rejoignent en tous points celles faites lors des analyses sur la colonne OV_{17}.

- le phénobarbital s'élimine en nature durant les 5 premiers jours.
- les pics pouvant être des métabolites sont faibles pour les deux premiers jours d'élimination mais au cinquième jour les 4 pics sont en proportion convenable pour permettre une séparation. Les résultats sont identiques aux essais précédents.

CONCLUSION :

L'utilisation de la colonne OV_1 n'a pas favorisé l'étude des métabolites du phénobarbital mis en évidence sur la colonne OV_{17} initialement préconisée.

Pour les autres Barbituriques étudiés nous donnerons les temps de rétention établis sur cette colonne et mentionnerons seulement les résultats dans la mesure où ils compléteront les constatations premières faites sur la colonne OV_{17}.

INTOXICATION CHRONIQUE

Les animaux sont traités par des doses quotidiennes de Phénobarbital afin de déclencher chez eux au bout de quelques jours, une intoxication chronique.

Dès les premiers temps de notre travail nous nous sommes aperçus que les animaux résistaient bien aux prises quotidiennes de Barbiturique et nous avons dû augmenter considérablement les doses. Après quelques semaines de traitement nous avons pu cependant obtenir quelques résultats que nous exposons dans ce paragraphe.

1° -Conditions expérimentales

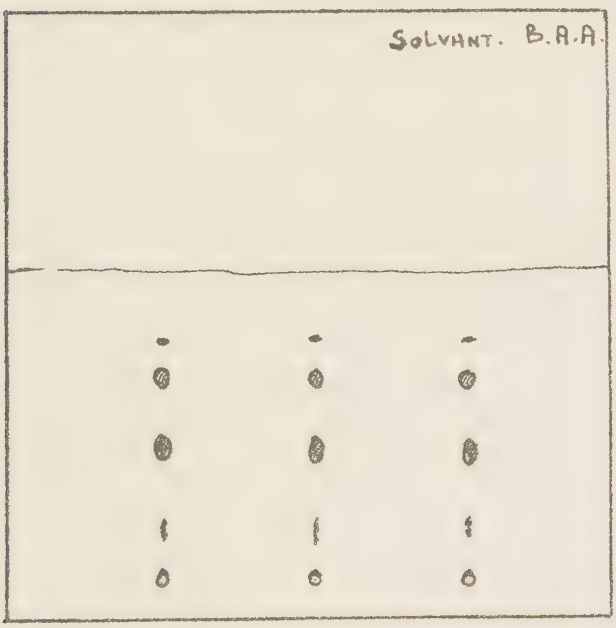
Dose administrée : on administre journalièrement 15 mg par kilo à des séries de 4 rats d'un poids moyen de 400 g.

Voie d'administration : sondage oesophagien d'une solution aqueuse tamponnée à PH 8.

Traitement des urines : les urines sont recueillies chaque jour et notre expérimentation a duré 1 mois et demi sans que nous ayons à signaler le décès d'un animal. Les urines ont subi le même traitement que dans le cas de l'intoxication aiguë.

2° - Chromatographie en couche mince

Nous avons procédé selon la méthode générale et nous nous limiterons à donner seulement ici le schéma d'un chromatogramme type obtenu après 1 mois et demi de traitement.



3° - Chromatographie en phase gazeuse

Nous avons appliqué la technique générale et utilisé la colonne OV_1.

Nous avons obtenu 4 pics constants de temps de rétention :

- 1170 sec.
- 1365 sec.
- 1555 sec.
- 1730 sec.

Sur l'ensemble des résultats nous pouvons dégager deux remarques :

1 - Les 4 pics ont des surfaces faibles et sont toujours discrets même en fin de traitement. Les effets cumulatifs ne semblent pas importants pour la dose absorbée qui est relativement grande puisqu'elle correspond à l'absorption journalière de 350 mg pour un homme de 70 Kg.

2 - Les 4 pics obtenus ont les mêmes temps de rétention que ceux signalés dans l'intoxication aiguë. Le Phénobarbital se métaboliserait donc selon le même processus qu'il soit ingéré à dose massive ou à doses faibles mais répétées.

* * *

B A R B I T A L

***

Nos expériences ont porté dans le temps sur les urines de quatre rats soumis à une intoxication aiguë.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Dose administrée :

Le Handbook of Toxicology (19) mentionne comme valeur de la $D.L._{50}$ le poids de 300 mg/kg per os. Nous avons administré, dans un premier temps, la totalité de cette dose... "tous" les animaux sont morts... Par essais sucessifs nous permettant d'avoir un coma carus sans décès nous nous sommes arrêtés à la dose de 180 mg/kg équivaut à 60 p 100 de la $D.L._{50}$, ce qui représente 80 mg pour chaque animal d'un poids moyen de 480 g.

Voie d'administration :

Par sondage oesophagien d'une solution aqueuse tamponnée à pH 8.

Maintien des animaux :

Les animaux ont été maintenus séparément dans des cages à métabolisme et la récolte des urines a été effectuée toutes les 24 heures du premier au quinzième jour, car le Barbital a une action longue et progressive et une élimination lente. Tous les animaux ont présenté un coma d'ure durée de 18 heures en moyenne.

Le volume des urines recueilli est mentionné dans le tableau suivant.

Jours d'Elimination / Volumes	1 j	2 j	3-4 j	5 j	6-7 j	8-9 j	10-11 j
Volume moyen pour 1 rat (en ml)	10	12,5	20	16	8,5	12	18

Traitement des urines : technique identique à celle du Phénobarbital.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Nous avons opéré selon la méthode générale

Le résidu d'extraction est repris par 0,5 ml d'éthanol. Les dépôts sont de 15 mµl.

1° - Révélation au Lemaire et à la Diphénylcarbazone :

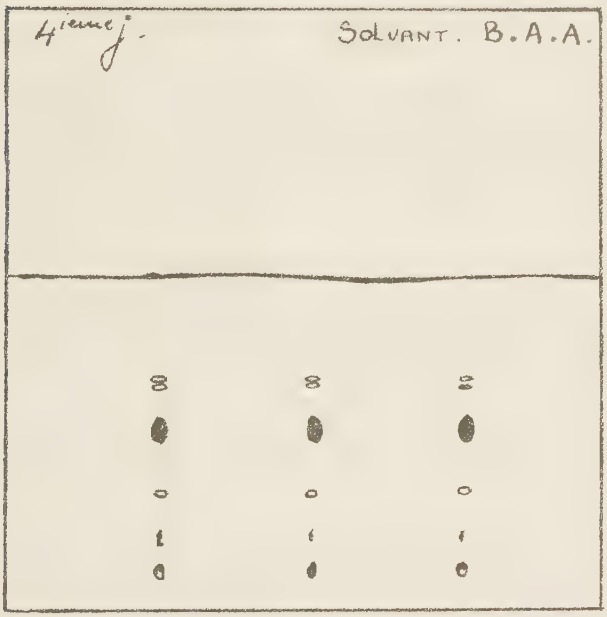
Les chromatographies en couche mince ont été pratiquées pour tous les extractifs et nous ont amené à dégager les remarques suivantes :

- à partir du onzième jour d'élimination il ne reste plus de Barbital intact ou tout au moins en quantité décelable en chromatographie en couche mince.

- les 1-2-3 et 4ème jour d'élimination nous obtenons un certain nombre de spots métaboliques qui présentent des intensités de coloration différentes.

- Schéma d'un chromatogramme en chromatographie en couche mince.

Nous donnons ici les résultats obtenus sur les urines du quatrième jour après l'administration de la dose massive de Barbital.



Au départ nous observons un spot bleu violet foncé de part la présence des pigments biliaires jaunes. Ce spot ne migre pas, il est surmonté d'un spot bleu plus clair qui décolle à peine de la ligne de base.

Viennent ensuite à Rf 0,11 un spot bleu violet, fugace qui disparait en séchant,

Rf 0,29 un spot violet
Rf 0,49 le spot violet mauve du Barbital intact
Rf 0,60 un spot écrasé de couleur bleue.
Rf 0,64 un spot écrasé de couleur rose.

Remarque :

Après hydrolyse alcaline du Barbital nous avons trouvé, au maximum à la 45 ème minute, 2 spots métaboliques à Rf 0 et Rf voisin de 0,20.

Dans le cas présent le spot de Rf 0 est identique au précédent, assez discret, il nous parait logique de dire que ce spot correspond à la formule proposée à ce moment là.

Nous avons choisi les urines du premier, deuxième, quatrième et sixième jour après l'administration de la dose car les extractifs éthérés se sont montrés les plus riches en produits de dégradation.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau page page 111.

Les deux derniers spots ne s'individualisant qu'à partir du quatrième jour après l'absorption de la dose. Sur les chromatogrammes antérieurs nous n'obtenons qu'un seul spot surmontant le spot de Barbital, à Rf 0,62.

Rf	Forme-couleur	1er J.	2ème J.	4ème J.	6ème J.
Spot départ	Rond - Bleu	+	+	+	+
0,035	Bleu - Violet	+	+	+	+
0,11	Bleu		$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$
0,29	Violet	$\frac{+}{-}$	+	+	$\frac{+}{-}$
0,49	BARBITAL	+++	+++	+++	+++
0,62	Bleu	+	+	Bleu 0,60	Bleu 0,60
				Mauve 0,64	Mauve 0,64

2° - Révélation des fonctions organiques :sur le chromatogramme du 4ème jour.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Rf	LEMAIRE	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	PDAB	PHENYL-HYDRAZINE
0	Rond-Bleu	++	++	Rose	
0,035	Bleu	+	++	Jaune	
0,11	Bleu	±			
0,29	Mauve				
0,49	Violet				
0,60	Bleu		+	Rose	
0,64	Mauve		+	Rose	

Il ressort de ces résultats que le rat excrète quatre métabolites en plus de ceux obtenus après hydrolyse alcaline.

Il est difficile d'établir des correspondances entre les spots obtenus lors de l'hydrolyse alcaline d'une solution témoin de Barbital et ceux que l'on met en évidence dans les urines des rats traités par ce même Barbiturique.

Il faut signaler que dans l'un et l'autre cas nous obtenons en dehors du spot de Barbital intact des spots discrets sur lesquels les réactions de fonctions sont délicates à observer car le résultat dépend souvent de la quantité de produit mis en jeu ainsi que de la sensibilité de la réaction.

Chez l'homme le Barbital est éliminé en nature (15) (24).

Le rat élimine le Barbital non touché dans une large proportion. (30) Les auteurs (18) (14) ont identifié deux produits :

- l'acide 5 éthyl 1 Barbiturique ce qui correspond à une dé-éthylation de la molécule barbiturique,

- l'acide 5 éthyl 5'β hydroxy éthyl Barbiturique,

et ont détecté deux autres produits inconnus à l'état de traces.

Pour GOLSCHMIDT et WEHR (18) l'acide 5 éthyl Barbiturique représente 2,5 p 100 de la dose administrée. L'ensemble des produits de dégradation formés pouvant être évalué à 5 p 100 de la dose administrée.

De nos différents résultats tant sur les hydrolysats synthétiques que sur les urines de rats nous sommes tenté de dire que les deux spots de départ présentant des Rf de 0 et ≠0 sont identiques et PEUVENT, DANS LE CAS PRESENT, ETRE ASSIMILES A L'ACIDE DIETHYLMALONIQUE ET A SON DERIVE DECARBONYLE (LEBAU et COURTOIS p.1592).

Dans le cas des urines il faut admettre alors une ouverture du cycle de la malonylurée. (57)

Les deux spots de Rf 0,11 -0,29 mis en évidence dans l'urine sont à l'état de traces et ne réagissent avec aucun des réactifs mis en jeu. Il est donc délicat de leur attribuer une formule.

Les deux derniers spots de Rf 0,60 et 0,64 formant un seul spot jusqu'au quatrième jour d'élimination, présentent un pouvoir réducteur important et réagissent avec le P.D.A.B. en donnant une coloration rose en faveur de la présence d'une fonction AMIDE.

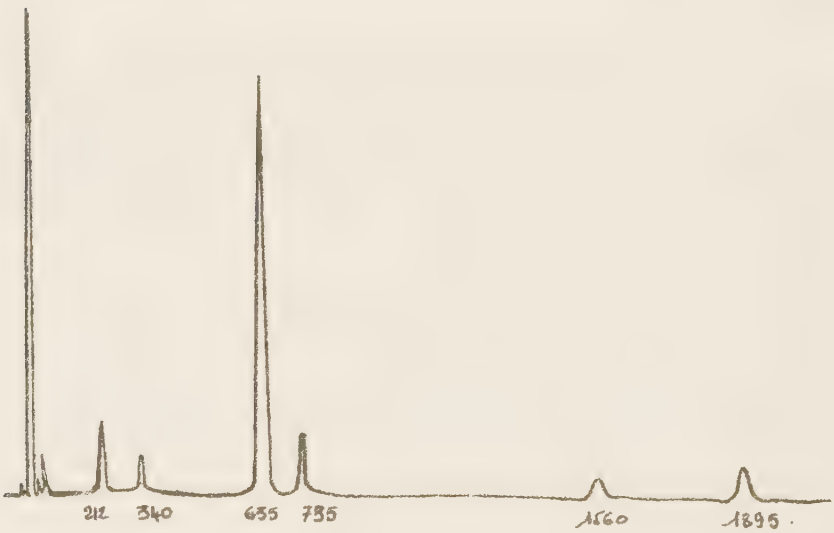
ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous exposons ici les résultats obtenus sur colonne OV_{17}.

1° - Apparition des pics

Comme dans le cas du Phénobarbital nous avons chromatographié des échantillons d'urines provenant de chaque jour après l'administration de la dose. Pour ce Barbiturique comme nous l'avons précisé dans l'étude chimique nous avons abaissé la température de départ à 60° C.

- Chromatogramme des urines du 5ème jour



Nous observons :

- 1 pic de temps de rétention de 212 sec.
- 1 pic de temps de rétention de 340 sec.
- le pic de Barbital de temps de rétention de 635 sec.
- 1 pic de temps de rétention de 735 sec.
- puis 2 autres pics très petits de temps de rétention 1560 sec. et 1895 sec.

Nous signalons la présence des pics de temps de rétention de 212, 340 et 735 sec. car ils sont présents dans la moyenne de nos essais, mais leur apparition est capricieuse et non constante ; leur importance est toujours très réduite.

Pour aucune de nos expériences nous n'avons pu chiffrer nos résultats.

Le Barbital s'élimine très lentement et assez régulièrement comme nous avons pu le constater tout au long de nos essais. Et nous sommes amené à dire que seule la présence du Barbital permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'une intoxication aiguë par ce Barbiturique.

2° - Séparation des pics

Les urines du cinquième jour ont été soumises à une chromatographie en couche mince et le chromatogramme a été divisé en trois parties.

Chaque zone a été traitée comme dans le cas du Phénobarbital.

- La zone a correspond aux spots de Rf 0 - 0,035 d'acidité et de pouvoir réducteur vis-à-vis du $KMnO_4$ notables. La chromatographie en phase gazeuse de cette partie fait apparaitre deux spots très petits de temps de rétention de 212 et 340 sec.

- La zone b correspond aux 2 spots de Rf 0,11 -0,29 très discrets en chromatographie en couche mince et de réactions analytiques pratiquement nulles. Nous ne sommes pas étonnés de ne rien récupérer en phase gazeuse, le chromatogramme est parfaitement plat.

- La zone c comporte les trois derniers spots de Rf 0,49 - 0,60 - 0,64. La chromatographie en phase gazeuse permet de retrouver le pic de Barbital de temps de rétention de 635 sec.

Nous pouvons constater que dans la zone $_a$ les 2 spots révélables en chromatographie en couche mince au réactif SO_4Hg - Diphénylcarbazone sont méthylables et se retrouvent en chromatographie en phase gazeuse. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le Phénobarbital, et comme pour ce dernier une différenciation des deux pics nous a été impossible à réaliser.

Dans la zone c, ni le spot de Rf 0,60, ni celui de Rf 0,64 n'apparaissent. Mais il faut préciser que ces spots sont faibles et que, pour cette raison, leur récupération quantitative est peu probable.

La même constatation est valable pour les spots de la zone b.

Remarques :

1 - L'utilisation de la colonne OV_1 n'a rien apporté de plus à nos constatations précédentes. Les résultats sont en tous points identiques.

2 - Enfin nos essais d'intoxication chronique réalisés dans les mêmes conditions que pour le Phénobarbital ont permis malgré un travail rendu délicat par les faibles quantités de produits obtenus, de confirmer les résultats exposés pour l'intoxication aiguë.

* * *

BUTOBARBITAL

****

Comme pour le Phénobarbital et le Barbital, nous utilisons 4 rats soumis à une intoxication aiguë.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

* Dose administrée

Dans les mêmes conditions que pour le Phénobarbital, nous avons administré 65 mg à chaque rat d'un poids moyen de 210 g soit 310mg/kg.

* Volumes d'urines recueillis

Jour d'élimination	1 j	2 j	4 j	5 j	6 j	8 j
Volume moyen recueilli pour un rat	12 ml	9 ml	6 ml	7,5 ml	7,5 ml	12 ml

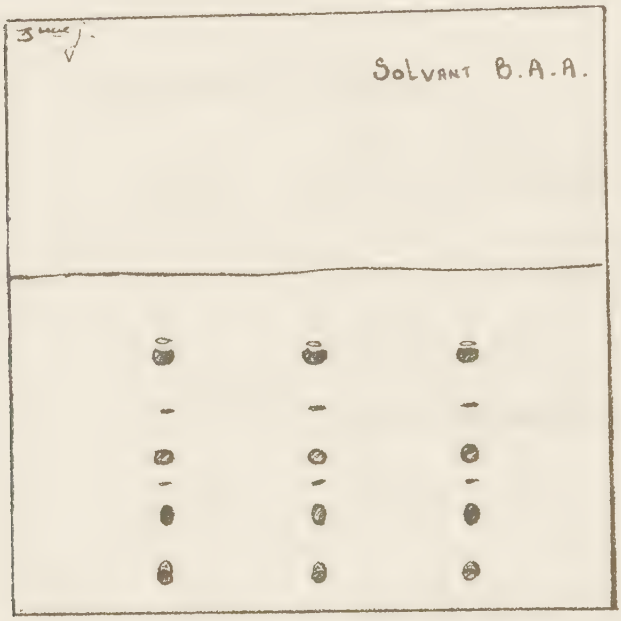
* Traitement des urines

Identique au Phénobarbital. Nous avons poursuivi nos expériences pendant 8 jours.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

* Révélation au sulfate mercurique et à la diphénylcarbazone

Schéma d'un chromatogramme au troisième jour



Le chromatogramme révélé par le réactif sulfate mercurique - diphénylcarbazone nous permet de visualiser :

- au départ, un spot bleu vif surmonté d'un spot bleu violet dont on peut estimer le Rf à 0,05,

- ensuite viennent 3 spots importants :

  - Rf 0,23 un spot arrondi de couleur rose mauve,
  - Rf 0,39 un spot mauve,
  - Rf 0,74 un spot rose mauve.

En plus de ces cinq principaux spots, nous notons la présence de spots intermédiaires de couleur fugace et de forme

aplatie :

- à Rf 0,35
- à Rf 0,58
- à Rf 0,78.

Le spot de Rf 0,78 va s'individualiser de plus en plus nettement en fonction du temps alors que le spot de Rf 0,74 va diminuer.

Nous n'établissons pas ici un tableau montrant l'existence et l'importance des spots aux différents jours d'élimination car pour les deux premiers jours de notre expérience, chaque spot réagit de façon égale et les colorations identiques obtenues ne permettent pas d'estimer quantitativement l'importance des spots les uns par rapport aux autres. Au troisième jour, tous les spots diminuent et continuent de décroître progressivement jusqu'au huitième jour.

* Révélation des fonctions organiques

Rf	LEMAIRE	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	P.D.A.B.
0	bleu	+	+	rose
0,05	bleu violet	léger	léger	jaune
0,23	rose mauve			0
0,39	mauve	léger	léger	
0,74	rose mauve	léger	+	
0,78	violet		+	rose léger

Conclusion

Pour le Butobarbital, nous avons remarqué que les spots étaient tous parfaitement révélés au réactif sulfate mercurique - diphénylcarbazone, mais que les réactions analytiques pratiquées étaient toujours faiblement positives et rendaient l'interprétation des résultats délicate.

L'étude faite en chromatographie en couche mince nous permet de résumer ainsi nos résultats.

- Le spot de Rf 0 présente seul une acidité évidente au réactif de Guillaumin tandis que les spots de Rf 0,05, 0,39 et 0,74 réagissent très légèrement avec ce même réactif.

- Les spots de Rf 0, 0,74,et 0,78 sont très réducteurs vis-à-vis du $KMnO_4$ en milieu sulfurique. Les spots de Rf 0,05 et 0,39 sont eux plus faiblement réducteurs.

- Enfin, les spots de Rf 0 et 0,78 réagissent au P.D.A.B. en donnant une coloration rose alors que le spot de Rf 0,05 se colore en jaune après pulvérisation de ce réactif.

Le rat excrète 4 métabolites importants mais rien ne nous permet de différencier parmi eux l'acide éthyl 5(hydroxy-3 butyl)5' barbiturique qui serait selon MAYNERT le métabolite principal de ce Barbiturique excrété par l'homme (31). Ce produit du métabolisme a été obtenu à l'état cristallisé et sa présence dans l'urine de chien confirmée ; sa structure a été définitivement élucidée par synthèse du produit. Un second métabolite a été identifié dans l'urine humaine, l'acide 5-éthyl-5'(3 carboxy)propyl barbiturique qu'il est tout aussi délicat de retrouver par nos techniques. Nous pouvons cependant envisager que ces deux substances se forment aussi chez le rat. Les réactions de métabolisation sus-citées intéressent seulement la chaîne butyl.

Et il n'est pas exclu qu'une partie du Butobarbital ingéré soit dégradée selon l'hypothèse émise par nous lors de l'étude chimique de cette même substance. Ceci serait en accord avec le grand nombre de produits de dégradation retrouvés dans l'urine de rats.

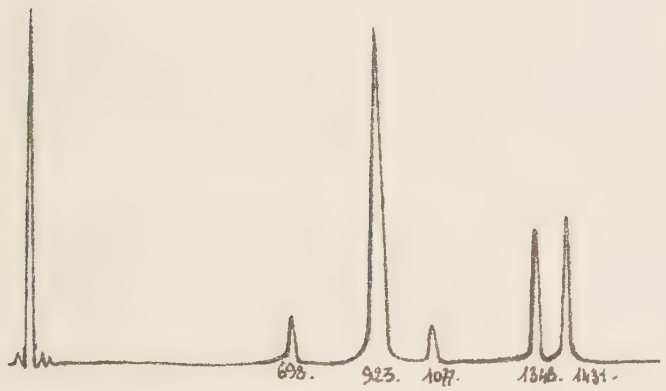
Il est alors intéressant de connaître parmi tous ces produits quels sont ceux qui sont méthylables et peuvent être chromatographiés en phase gazeuse.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons opéré dans les mêmes conditions que pour les deux premiers Barbituriques et avons utilisé la colonne OV_{17}

* Apparition des pics

Chromatogramme du deuxième jour



Nous obtenons :

- un pic à 698 secondes
- un pic à 923 secondes
- un petit pic à 1 077 secondes
- un pic moyen à 1 348 secondes
- un pic moyen à 1 431 secondes.

- Le pic à 923 secondes correspond au Butobarbital intact.

- Les autres pics présentent des surfaces restreintes par rapport à celle donnée par le pic témoin de Butobarbital.

- Au troisième jour, tous les pics diminuent de façon considérable, alors que dans nos chromatographies en couche minces, cette diminution d'intensité n'est pas évidente

puisque nous notons encore la présence du Butobarbital les quatrième et cinquième jours. Par chromatographie en phase gazeuse le Butobarbital intact n'a pas été retrouvé au-delà de ce jour. Dans certains chromatogrammes, le pic à 1431 secondes est précédé d'un petit pic à 1411 secondes.

- Au quatrième jour, le chromatogramme montre que seuls les pics à 1077, 1348 et 1431 secondes se maintiennent faiblement. Ils restent encore décelables à l'état de traces les septième et huitième jours.

* Séparation des pics

Malgré la faible importance des pics apparus en chromatographie en phase gazeuse, nous avons pratiqué la séparation des spots sur les urines du deuxième jour par notre technique en chromatographie en couche mince.

Le chromatogramme obtenu a été découpé en deux zones a et b.

La chromatographie en phase gazeuse de la zone a correspondant aux deux spots de Rf 0 et 0,05 ne permet pas de mettre en évidence de pic.

La chromatographie en phase gazeuse de la zone b correspondant aux spots de Rf 0,23, 0,39, 0,74 et 0,78 révèle :

- le pic du Butobarbital à 923 secondes,
- deux autres pics d'importance moyenne à 1348 et 1431 secondes lequel est précédé du pic à 1411 secondes.

Ces deux pics sont donc susceptibles d'identifier deux des trois spots de Rf 0,23, 0,39 et 0,78. Nous pensons que le dernier spot faible en chromatographie en couche mince n'est pas retrouvé en chromatographie en phase gazeuse.

CONCLUSION

L'étude du Butobarbital s'est révélée difficile et délicate, la chromatographie en phase gazeuse n'a pas permis de retrouver le pic témoin au-delà du troisième jour qui suit l'administration de la dose.

Les métabolites identifiés en chromatographie en couche mince n'ont pas été retrouvés en phase gazeuse : soit leurs structures ne se prêtent pas à la méthylation, soit leurs stabilités étant très fragiles, nos conditions opératoires ne sont pas compatibles avec leur maintien.

* *
*

S E C O B A R B I T A L

******

CONDITIONS EXPERIMENTALES

* Dose administrée

Dans les mêmes conditions que pour le Phénobarbital, nous avons administré une dose unique de 45 mg à chaque animal d'un poids moyen de 200 grammes soit 225 mg par kg.

* Volumes d'urines recueillis

Jour d'élimination	1 j	2 j	3 j	4 j	6 j	8 j
Volume moyen pour 1 rat	15 ml	12 ml	7 ml	7 ml	6 ml	6 ml

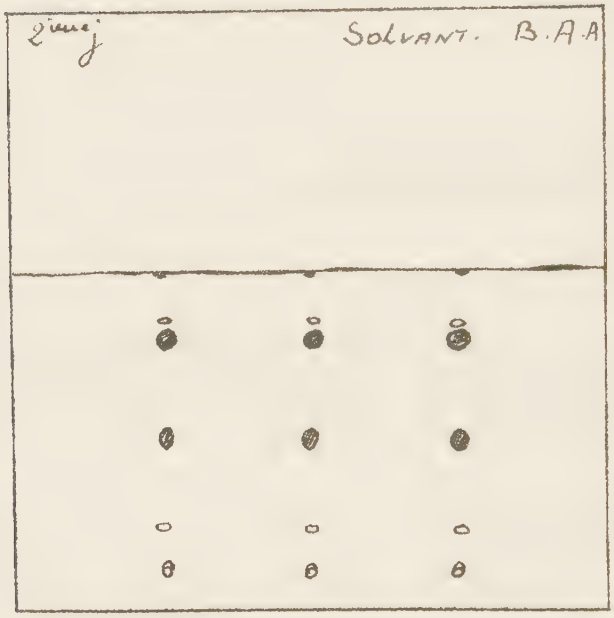
* Traitement des urines

Identique au Phénobarbital.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

* Révélation au sulfate mercurique et à la diphénylcarbazone

Schéma d'un chromatogramme au deuxième jour



- Au départ, nous observons un spot bleu vif qui ne décolle pas de la ligne de base puis au-dessus, à Rf 0,06, un spot violet qui n'est pas détaché du spot de départ mais qui s'individualise par sa coloration.

- Viennent ensuite :

. à Rf 0,16 un spot aplati assez mal délimité de teinte violet pâle,

. à Rf 0,44 un spot violet de forme allongée

. à Rf 0,79 le spot bleu du Sécobarbital,

. à Rf 0,89 un spot violet discret.

- Les spots ne vont pas se maintenir intacts dans les chromatogrammes des urines de chaque jour.

- Pour les trois premiers jours nous retrouvons chacun des spots précédemment décrits, mais déjà après 72 heures, le spot de Secobarbital a diminué d'intensité et le spot de Rf 0,89 discret lors des deux premières chromatographies apparaît plus distinctement.

- Au quatrième jour, les trois premiers spots présentent une intensité accrue tandis que les spots de Rf 0,44 et 0,79 continuent de diminuer.

- Enfin, au huitième jour, il ne reste plus que :

  . les 2 spots de Rf 0 et 0,06 ainsi que celui de 0,89,

  . le spot de Secobarbital n'est plus qu'à l'état de traces,

  . les spots de Rf 0,16 et 0,44 ont disparu une semaine après l'administration de la dose.

Le tableau ci-dessous montre l'existence et l'importance des spots les uns par rapport aux autres aux différents jours d'élimination.

Rf	1j	2j	3j	4j	8j
0	++	++	++	++	++
0,06	++	++	++	++	++
0,16	+	++	++	+	
0,44	+	+	+	+	
0,79	++	++	+	+	±
0,89	±	±	+	+	++

* Révélation des fonctions organiques

La mise en oeuvre des réactions analytiques sur les différents chromatogrammes va nous permettre de révéler la présence de spots qui ne réagissent pas avec le réactif de LEMAIRE choisi comme référence.

- Examen en U.V. du chromatogramme des urines au 2e jour

  . Les spots de Rf 0, 0,06, 0,16, 0,44, 0,79 se retrouvent parfaitement.

  . A Rf 0,34 et 0,20, on distingue deux taches d'absorption. Ces deux spots n'étaient pas apparus lors de la révélation au LEMAIRE.

  . La recherche des fonctions réductrices par le réactif au $KMnO_4$ en milieu sulfurique va confirmer l'existence d'une substance réductrice à Rf 0,20.

  . La pulvérisation du réactif au P.D.A.B. individualise, par une tache rose, la substance de Rf 0,34.

- L'ensemble des résultats obtenus est consigné dans le tableau ci-après.

Rf	LEMAIRE	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	P.D.A.B.	U.V.
0	bleu	+	++		+
0,06	violet	+	++	léger	+
0,15	violet	+	+	rose	+
0,20			+		±
0,34				rose	+
0,44	bleu-violet	très léger	+		+
0,79	bleu		+		+
0,89	violet	+	+	violet-rose	

L'étude en chromatographie en couche mince a mis en évidence 7 spots pouvant provenir du métabolisme du Secobarbital.

- Les spots de Rf 0, 0,06, 0,15 et 0,89 sont acides et réducteurs.

- Les spots de Rf 0,06, 0,15 et 0,89 réagissent au P.D.A.B.

- Le spot de Rf 0,44 présente une légère acidité au réactif de GUILLAUMIN et réduit le $KMnO_4$ en milieu sulfurique.

- Le spot de Rf 0,79 correspond au Secobarbital intact, il est légèrement réducteur.

- Enfin, les deux spots à Rf 0,20 et 0,34 réagissent, le premier avec le $KMnO_4$, l'autre avec le P.D.A.B., mais ne sont pas révélés par le sulfate mercurique et la diphénylcarbazone.

L'acide 5(méthyl 1 butyl)barbiturique est identifié chez le rat (34) et chez l'homme (45) par NIYOGI par chromatographie en phase gazeuse sur chromosorb. à 5 % de DC 200.

L'acide 5 hydroxy, 5(1 méthyl butyl)barbiturique a été retrouvé par chromatographie sur papier ainsi que des dérivés d'acide barbiturique 5-5' disubstitué (56). COCHIN et DALY (9) retrouvent en chromatographie en couche mince l'acide allyl 5(hydroxy 1 méthyl 1 butyl) 5 barbiturique, l'acide (méthyl 1 butyl) 5 barbiturique, ainsi que deux autres métabolites.

WADDELL a identifié dès 1962 plusieurs métabolites du Secobarbital à partir des urines humaines (56).

Par simple chromatographie sur papier trois dérivés furent détectés après élutions des taches suivies d'extractions et de purifications.

L'analyse élémentaire, la spectrophotométrie U.V. et I.R. ainsi que diverses réactions chimiques ont permis d'identifier :

- les deux formes stéréo-isomères de l'acide allyl 5 (hydroxy 3 - méthyl 1 butyl)5 barbiturique.

- l'acide (dihydroxy 2, 3 propyl)5(méthyl 1 butyl)5 barbiturique, la structure de ce dérivé a été confirmée par synthèse du produit authentique (Sécodiol du commerce).

Nous avons entrepris l'étude en phase gazeuse des extraits acides obtenus à partir d'urines de rats traités par le Secobarbital. Nous nous sommes attachés à maintenir les conditions opératoires identiques à celles où nous sommes placés dans le cas de recherche des toxiques organiques post-mortem.

Il s'agit de savoir si dans le cas d'examen systématique des causes de la mort, nous pouvons par les méthodes mises en oeuvre déceler la présence d'un Barbiturique par les spots ou les pics qui l'accompagnent.

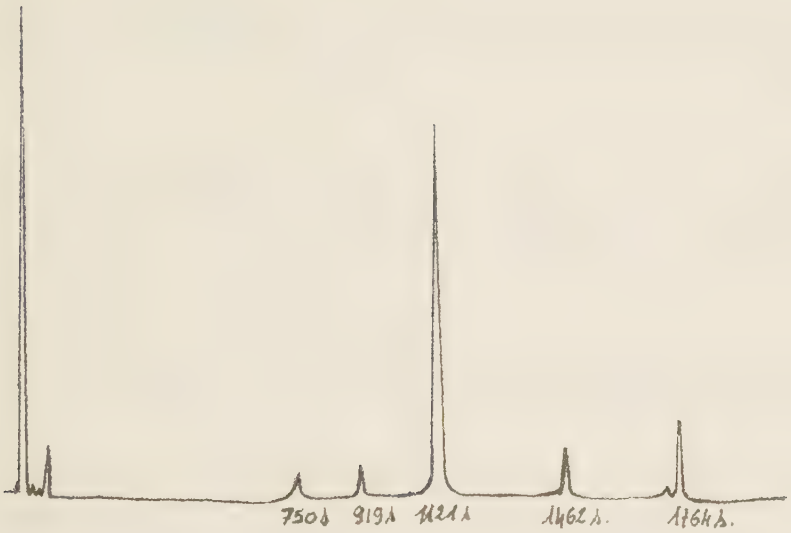
ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons utilisé la colonne OV_{17}.

* Apparition des pics

Schéma d'un chromatogramme au 2e jour d'élimination

voir schéma page suivante.



Nous obtenons :

- deux pics très petits de temps de rétention : 750 et 919 secondes.
- puis le pic de Secobarbital à 1 121 secondes.
- à 1 462 secondes un pic isolé d'importance moyenne.
- enfin, à 1 764 secondes un pic qui présente un petit épaulement antérieur.

Dès le troisième jour :

- les pics à 750 et 919 secondes disparaissent,
- le pic de Secobarbital diminue de façon notable.
- le pic à 1 462 secondes se maintient.
- deux pics de temps de rétention 1 688 et 1 764 secondes se distinguent nettement.

Au quatrième jour, il reste un pic de Secobarbital très petit, tandis que les pics à 1 462 secondes, 1 688 et 1 764 secondes diminuent d'intensité.

Passé le quatrième jour, tous les pics sont très petits. Dans certains chromatogrammes, nous avons pu constater un épaulement (temps de rétention 1 855 secondes) du pic à 1 764 secondes.

La chromatographie en phase gazeuse des urines de rats traités par une dose massive de Secobarbital met en évidence cinq pics.

- l'apparition des pics à 750 et 919 secondes dans les chromatogrammes des deux premiers jours, est constante mais leur importance est très réduite par rapport aux autres pics.

- Le Secobarbital disparaît très rapidement, nous le retrouvons de façon indubitable pendant les trois jours qui suivent l'absorption de la dose. Par la suite, sa mise en évidence est très alléatoire. En effet, nous avons du concentrer le milieu et augmenter la sensibilité de l'appareil pour nous assurer de sa présence. Il peut donc passer inaperçu lors d'expertises non orientées.

- Enfin, les deux pics à 1 462 et 1 764 secondes sont eux toujours présents. Leurs surfaces varient en fonction du jour considéré. Nous notons qu'ils sont importants les deux premiers jours puis qu'ils diminuent progressivement jusqu'au huitième jour.

* Séparation des pics

Nous avons découpé la plaque à chromatographie en deux zones a et b. La chromatographie en phase gazeuse de la zone a correspondant aux spots de Rf 0, 0,06, 0,16 permet de noter un tout petit pic de temps de rétention voisin de 1 462 secondes.

La chromatographie en phase gazeuse de la zone b correspondant aux spots de Rf 0,44, 0,79 et 0,89 permet de retrouver le pic de Sécobarbital ainsi que celui de 1 724 plus un tout petit pic à 1 462.

La présence dans les deux chromatogrammes du pic à 1 462 nous a paru suspecte. Nous avons vérifié que ce pic ne correspond pas à une impureté soit de l'urine, soit des réactifs d'extraction ou de la méthylation, soit du gel de silice.

Nous pensons donc pouvoir attribuer ce pic à un spot se trouvant à la limite des deux zones de prélèvement étant donné qu'il existe une imprécision sur la migration d'un spot sur l'ensemble de la plaque, quant au pic de temps de rétention 1 764, il ne peut s'agir en fait que du spot de Rf 0,89, l'autre pic représentant le Sécobarbital intact.

* *
*

HEXOBARBITAL

******

CONDITIONS EXPERIMENTALES

* Dose administrée

Dans les mêmes conditions que pour le Phénobarbital nous avons administré une dose unique de 45 mg à chaque animal d'un poids moyen de 220 grammes soit 205 mg par kg.

* Volumes d'urines recueillis

Jour d'élimination	1j	2j	3j	4j
Volume moyen pour 1 rat	12 ml	7,5 ml	18 ml	9 ml

Dans le cas de l'Hexobarbital, nous donnons les résultats obtenus pour les 4 premiers jours de notre expérimentation car des essais antérieurs faits sur cette même substance ont permis de démontrer que la métabolisation et l'élimination de ce produit étaient très rapides.

A partir du quatrième jour, toute recherche est vaine.

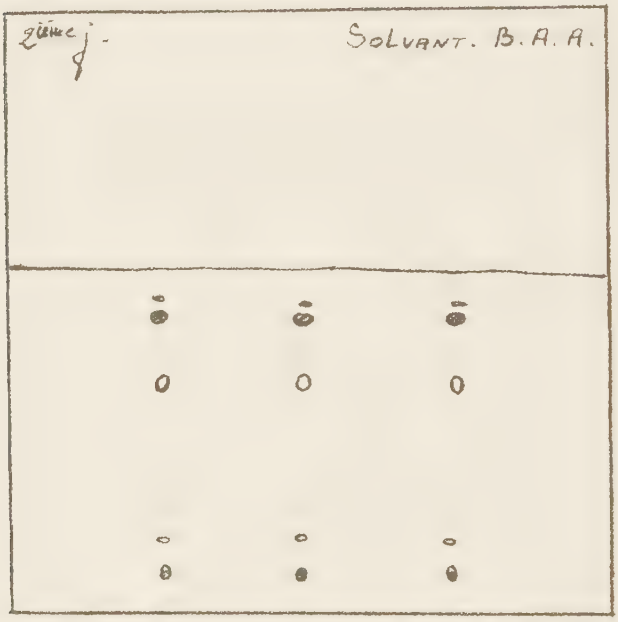
* Traitement des urines

Identique au Phénobarbital

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

* Révélation au sulfate mercurique de LEMAIRE et à la diphénylcarbazone

Schéma d'un chromatogramme au deuxième jour



Comme pour les quatre premiers Barbituriques étudiés, nous obtenons deux spots au départ, l'un qui ne décolle pas de la ligne de base, l'autre très discret de Rf peu différent de zéro qui frange le premier.

A la suite de ces deux spots apparaissent :

- à Rf 0,12 une tache bleue mal définie
- à Rf 0,65 un spot mauve rose très léger
- à Rf 0,86 le spot d'Hexobarbital
- à Rf 0,92 un spot violet.

Nous avons remarqué que lors de la chromatographie en couche mince des urines des premier et deuxième jours, deux spots s'individualisent lors de la migration. Il s'agit :

- d'un spot rose à Rf 0,87
- d'un spot bleu à Rf 0,92.

Les colorations de ces deux spots s'atténuent lors du séchage du chromatogramme. Ces spots sont présents dans les urines des troisième et quatrième jours mais beaucoup plus discrets et n'existent plus au cinquième jour.

Pour les quatre premiers jours choisis de notre expérience, nous avons observé tous les spots précédemment révélés au sulfate mercurique et à la diphénylcarbazone. Dans cet intervalle de temps, seul le spot d'Hexobarbital va diminuer d'intensité, les autres spots se maintiennent de façon identique. Au cinquième jour, on ne distingue qu'une faible traînée bleue, aucun spot n'apparaît.

* Révélation des fonctions organiques

Examen en U.V. du chromatogramme des urines du deuxième jour.

- Dans un premier temps, nous avons examiné le chromatogramme à 254 mμ : seul le spot d'Hexobarbital à Rf 0,86 absorbe à cette longueur d'onde.

- L'examen à 366 mμ permet de visualiser des spots à Rf 0,38, 0,80, 0,86, et 0,92.

La mise en oeuvre des réactions analytiques permet d'obtenir les résultats consignés dans le tableau ci-après.

Rf	LEMAIRE	GUILLAUMIN	$KMnO_4$	P.D.A.B.	U.V.
0	violet	+	+		
0,12	violet	+	+		
0,65	mauve			léger	
0,86	violet	+	+		+
0,92	violet				+

Cette étude en couche mince a permis de révéler quatre spots pouvant provenir de la métabolisation de l'Hexobarbital.

Les spots de Rf 0 et 0,12 sont acides et réducteurs.

Le spot de Rf 0,65 révélé très légèrement au LEMAIRE réagit faiblement au P.D.A.B.

Enfin, le spot de Rf 0,92 de coloration rose avant toute révélation absorbe en U. V.

L'Hexobarbital a fait l'objet des travaux de BUSH-BUTLER et DICKISON (47) qui ont isolé quatre métabolites identifiés, un au produit de déméthylation, les trois autres possédant une fonction cétone.

L'oxydation qui précède la déméthylation se fait pour un des métabolites cétoniques au niveau des microsomes du foie en ce qui concerne la chaîne cyclo-hexenyle (11). Une petite quantité représentant 0,1 à 0,2 % de la dose administrée est éliminée en nature (46).

FREY (16) va confirmer la présence de ces 4 composés tandis que des travaux effectués sur l'urine de lapin par TSUKAMOTO et YOSHIMURA (48) (51) vont préciser la nature chimique d'un dérivé d'oxydation : l'acide (oxo-3-cyclo-hexène 1-yl-1)-5-diméthyl-3-5-barbiturique et mettre en évidence un produit résultant de l'ouverture du cycle barbiturique de l'Hexobarbital.

TSUKAMOTO et Coll. vont l'identifier par comparaison du point de fusion avec le produit de synthèse à la cyclohexenyl-N-méthyl-acétyl-urée (50).

L'étude des spectres I.R. va confirmer la structure de l'acide (oxo-3-cyclohexène-1-yl-1)-5-diméthyl-3-5-barbiturique et les spectres U.V. et I.R. vont identifier l'acide hydroxycyclohexényl-5-diméthyl-3-5-barbiturique (50) (49).

Ces trois produits représentent 0,5, 1 et 5 p. 100 de la dose administrée.

Poursuivant ces travaux, YOSHIMURA (54) identifie deux autres métabolites :

- l'acide (oxo-3-cyclohexène-1-yl)-5-méthyl-5-barbiturique
- l'acide (hydroxy-3-β-cyclohexène-yl-1)-5-diméthyl-3-5-barbiturique.

L'ensemble des métabolites ne représentent cependant que 10 p. 100 de la dose administrée.

En 1958, YOSHIMURA (55) va confirmer la structure du métabolite hydroxylé.

Enfin, TSUKAMOTO, YOSHIMURA et TOKI (51) extraient cinq métabolites (25,7 p. 100 de la dose administrée) le principal d'entre eux étant le dérivé hydroxy-3-α interconvertible en céto-3 (52).

TOKI et TAKENOUCHI (47) ont isolé l'hydroxy-3-α-hexobarbital sous forme de glucuronate.

Par ce bref rappel bibliographique, nous pouvons mesurer le nombre important de métabolites connus dans l'urine de rat en supposant que le métabolisme de l'Hexobarbital se déroule de façon identique chez cet animal et chez l'homme. Notre but est de mettre en évidence, au cours de nos expertises toxicologiques in vivo ou post mortem, la ou les substances pouvant

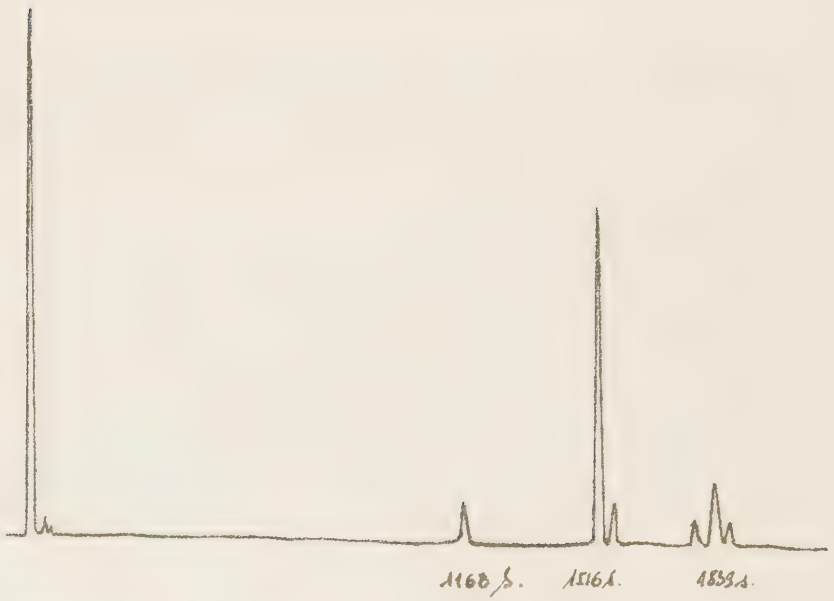
être à l'origine de l'intoxication ou de la mort et nous voulons savoir si lors de notre analyse systématique, nous pouvons par nos techniques habituelles mettre en évidence les produits dérivés de la substance pure et par cela même affirmer que tel toxique est en jeu.

ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons utilisé la colonne OV_{17}.

* Apparition des spots

Schéma d'un chromatogramme au deuxième jour d'élimination



Nous obtenons :

- un petit pic à 1 168 secondes,
- le pic de l'Hexobarbital à 1 516 secondes,
- un pic à 1 544 secondes,
- puis un pic à 1 787 secondes de faible importance suivi
- d'un pic à 1 839 secondes,
- enfin, le pic à 1 878 secondes est accolé au précédent.

Ces pics sont présents jusqu'au troisième jour d'élimination mais nous pouvons constater dès les premiers jours que la métabolisation de l'Hexobarbital est intense et qu'un faible pourcentage de la dose administrée est retrouvé en nature.

L'ensemble de ces pics se maintient jusqu'aux cinquième et sixième jours après absorption de la dose mais à ce moment-là, les surfaces des pics sont très réduites.

* Séparation des pics

Nous avons découpé la plaque à chromatographie en deux zones.

La zone a correspond aux deux spots du départ ainsi qu'au spot de Rf 0,12.

La zone b correspond aux spots de Rf 0,65-0,86 et 0,92.

. Chromatographie en phase gazeuse de la zone a : aucun pic.

. Chromatographie en phase gazeuse de la zone b :

- le pic à 1 168 secondes,
- le pic à 1 516 secondes accompagné d'un très petit pic à 1 544 secondes,
- enfin, le pic à 1 839 secondes présente un petit épaulement postérieur.

Dans la zone b, nous retrouvons 4 pics, or théoriquement, nous avons prélevé 3 spots visualisés par le réactif de Lemaire et il est délicat par cette simple analyse chromatographique d'attribuer un pic à chacun de ces trois spots.

* *

*

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

***

Lors de nos expertises toxicologiques, en utilisant la chromatographie en couche mince, nous avons constaté que les Rf des produits éliminés par un organisme quelqu'il soit ne correspondaient pas toujours aux Rf de nos références.

Le but de notra travail a été :

- de tenter d'IDENTIFIER à partir des produits du métabolisme le toxique en cause,

- de savoir si au cours de nos recherches des causes de la mort nous pouvions, en associant les techniques chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse, CONCLURE à la présence d'un dérivé barbiturique.

Dans la première partie, afin de connaître la nature des produits de dégradation de la molécule barbiturique, nous avons pratiqué l'hydrolyse alcaline des solutions témoins de cinq Barbituriques d'utilisation thérapeutique courante : Phénobarbital, Barbital, Butobarbital, Secobarbital, Hexobarbital.

Après un bref exposé des techniques utilisées et des conditions opératoires, les résultats obtenus sont répartis en cinq sous-chapitres correspondant à chaque Barbiturique.

Les hydrolyses ont été arrêtées à des temps progressivement croissants. Chaque hydrolysat a été chromatographié séparément dans le but de déterminer la durée d'hydrolyse permettant d'obtenir tous les dérivés de dégradation à une concentration satisfaisante pour la mise en oeuvre des réactifs de révélation.

La chromatographie en couche mince montre que quelque soit le Barbiturique nous observons la présence de deux spots caractérisés par des Rf faibles. Ils présentent des réactions analytiques comparables. Nous avons pensé qu'ils résultaient de

l'ouverture du cycle de la malonylurée, l'un pouvant être le dérivé malonylurique, l'autre le produit provenant de la décarboxylation du précédent. Ils apparaissent toujours ensemble et quelquefois même pour des temps d'hydrolyse très courts. Le solvant alcalin benzène-acétone-ammoniaque ne leur permet pas de décoller de la ligne de base mais nous avons pu constater qu'avec les éluants neutres ces spots présentaient des Rf tout à fait mesurables.

Pour le Phénobarbital, le Secobarbital et l'Hexobarbital, le réactif sulfate mercurique - Diphénylcarbazone révèle un spot de Rf 0,15, tandis qu'un autre spot à Rf 0,20 apparaît pour le Barbital, le Butobarbital et le Secobarbital. D'autres spots sont mis en évidence par ce réactif général des dérivés barbituriques ; nous pensons qu'il s'agit de produits intermédiaires entre le dérivé malonylurique et les produits ultimes de l'hydrolyse à savoir l'urée et l'ammoniac que nous avons retrouvés.

Il nous a paru intéressant de savoir si les spots obtenus en couche mince étaient méthylables et pouvaient être chromatographiés en phase gazeuse.

Après plusieurs essais destinés à sélectionner les phases stationnaires utilisables pour les dérivés barbituriques, nous avons choisi la phase OV_{17} sur laquelle la plupart de nos expériences ont été faites.

De l'étude en phase gazeuse nous pouvons conclure :

- les deux spots de faibles Rf sont méthylables et ont été retrouvés pour le Phénobarbital, le Butobarbital et l'Hexobarbital,

- le Barbital et le Secobarbital s'hydrolysent faiblement. Pour le dernier le résidu d'extraction éthérée est encore très important après une heure trente d'hydrolyse.

La seconde partie est consacrée à l'expérimentation sur l'animal des cinq Barbituriques précédemment cités.

Dans un premier temps, nous avons essayé de provoquer une intoxication chronique chez le rat par administration quotidienne de petites doses. Au bout de un mois et demi, nous avonc obtenu des spots métaboliques si faibles que nous ne pouvions pas effectuer valablement les réactions analytiques et encore moins tenter la séparation de ces dérivés.

Nous avons alors administré per os à des séries de quatre rats des doses massives de Barbituriques susceptibles de provoquer un coma carus sans décès.

Nous avons suivi et tenté d'identifier, tant en chromatographie en couche mince qu'en phase gazeuse, les différents produits d'élimination afin d'établir un schéma et un tracé chromatographiques permettant de déceler le toxique en cause à partir des spots et des pics qui l'accompagnent.

La chromatographie en couche mince a permis d'observer :

- deux spots comparables à ceux obtenus lors de nos hydrolyses alcalines. La présence de ces deus spots de Rf faibles peut donc orienter les recherches vers un DERIVE DE LA MALONYLUREE.

- les autres spots mis en évidence ont des Rf non comparables à ceux des produits d'hydrolyse. Les réactions analytiques effectuées n'ont pas permis d'élucider la nature chimique de ces dérivés. L'étude en spectrométrie U. V. et I. R. des métabolites aurait, en établissant l'identité chimique de ces produits, permis d'adapter nos réactifs de révélation aux fonctions organiques réellement existantes sur la molécule.

La voie biologique est donc différente de la voie chimique. Par hydrolyse enzymatique des solutions témoins nous aurions pu obtenir des produits de dégradation certainement plus proches des métabolites urinaires naturels.

Poursuivant notre travail, nous avons chromatographié en phase gazeuse les échantillons d'urines. Pour chaque Barbiturique nous avons établi un chromatogramme type parfaitement reproductible pour les conditions opératoires fixées.

L'étude de chacun d'eux amène les remarques suivantes :

- un grand nombre de pics métaboliques est mis en évidence (4 pics pour le Phénobarbital, le Butobarbital et le Secobarbital) (5 pics pour le Barbital et l'Hexobarbital).

- la surface de chacun est réduite.

- la somme des pics métaboliques représente un faible pourcentage par rapport à la quantité de Barbiturique éliminée en nature.

- la disparition du produit pur s'accompagne dans la majorité des cas d'une atténuation des pics annexes.

Il est donc particulièrement difficile, par les techniques que nous avons utilisées, de déceler la présence d'un dérivé barbiturique déterminé en se basant uniquement sur la mise en évidence de ses produits de dégradation. Toutefois, l'apparition en chromatographie en couche mince des deux spots de Rf faibles permet d'axer notre recherche en chromatographie en phase gazeuse sur un dérivé barbiturique. Cette méthode étant très sensible, la présence d'une petite quantité de produit intact, aussi minime soit-elle, peut alors rendre notre analyse fructueuse.

Nos expériences ont montré que dans la plupart des intoxications aiguës nous retrouvons très souvent le produit sous sa forme primitive : à ce moment-là le tracé chromatographique prend toute sa valeur.

* *

*

B I B L I O G R A P H I E

1. BRADDOCK J.I. - MAREC N.
J. Gas. Chromatog., 1964, 3 , 8 . 274.

2. BROCHMANN - HANSSEN E. - OLAWUYI - OKE T.
J. Pharm. Sci., 1969, 58 , 370-371.

3. BUTLER T. C.
Science , 1954, 120 , 494 .

4. BUTLER T. C. - MAHAFFEE C. et WADDEL W. J.
J. Pharm. Exp. Thér., 1954, 111 , 425 .

5. BUSH M. T. - BUTLER T. C.- DICKINSON H. L.
J. Pharmacol. Thérap., 1953, 108 , 104 .

6. CASTAGNOU R et ARTIGES A.
Thèse Doctorat Pharmacie n° 5 BORDEAUX 1968.

7. CASTAGNOU R. et GUYOT-JEANNIN Ch.
Toxicologie industrielle médicamenteuse et agricole
Traité de Biologie Appliquée - T.7-p72 -1969 PARIS Maloine Ed.

8. CLERC Y.
Thèse en Pharmacie n° 614 BORDEAUX 1971 ,

9. COCHIN J. et DALY J. N.
J. Pharm. Exp. Thér., 1963, 139 , 154 .

10. COOK J. G. H. - RILEY C. - NUNN R. F. - BUDGEN D. E.
J. Chromatog., 1961, 6 , 182-185 .

11. COOPER J. R. - BRODIE B. B.
J. Pharm. Exp. Thér., 1955, 114, 409.

12. CURRY A. S.
J. Pharm. Pharmacol., 1955, 7, 604.

13. CURRY A. S.
Progr. Chem. Toxicol., 1963, 1, 135.

14. EBERT A. G. - YIM G. K. W. - MIYA T. S.
Biochem. Pharmacol., 1964, 13, 1267.

15. FRAHM M. - GOTTESLEBEN A. et SOEHRING K.
Pharm. Acta. Helv., 1963, 38, 785.

16. FREY H. H.
Arch. Int. Pharmacodyn., 1959, 118, 12.

17. FREY H. H. - KRAUSE D. and SUDENDEY F.
Arzn. ei Mittel Forsch., 1959, 9, 294.

18. GOLDSCHMITH S. and WEHR R. Z.
Physiol. Chem., 1957, 308, 9.

19. HANDBOOK of TOXICOLOGY
Vol. 1 Ed. by WILLIAM-SSPECTOR, 1956, W. B. SAUNDERS COMPANY
Philadelphie and London.

20. JAIN N. C. - FONTAN C. R. - KIRK P. L.
J. Microchem., 1964, 8, 28-34.

21. KUTT H. - WINTERS W. - SCHERMAN R. - Mc DOWELL F.
Arch. Neurol., 1964, 11, 649.

22. LEACH H. - TOSELAND P. A.
Clinica Chimica Acta , 1968 , 20 , 195-203.

23. LE MOAN et coll.
Ann. Fals. Exp. Chim. , 1969 , n° 686 , 207.

24. LOUS P.
Acta Pharmacol. Toxicol., 1954 , 10 , 134.

25. MACEK K. - VECERKOWA J. and STANISLAVOVA J.
Pharmazie, 1965, 20 , 605.

26. MACEK K. and VECERKOVA J.
In "Gadamers Lehrbuch der Chemischen Toxikologie and Anleitung zur Ausmittlung der Gifte" (E. Graf and F. R. Preuss, Ed.) 3rd Ed., Vol. 2, p. 1 Vandenhoeck and Ruprecht, GOTTINGEN, 1966.

27. MACHATA G.
"Methods of Forensic Science", Vol. 4, Interscience Publishers, Division of John Wiley and Sons, NEW YORK 1965 p. 238.

28. MACHATA G. - BATTISTA H. J.
Mikrochim. Acta , 1968 , n° 4 , 866-874.

29. MARTIN H. F. - DRISCOLL J. L.
Anal. Chem. , 1966 , 38 , 345-346.

30. MAYNERT E. W. et VAN DYKE H. B.
J. Pharm. Exp. Ther., 1950 , 98 , 180.

31. MAYNERT E. W.
J. Biol. Chem. , 1952 , 195 , 403.

32. Mc CONNELL DAVIS T. W.
J.Chromatog., 1967, 29 , 283.

33. METAIS - SCHNEIDER
Thèse Pharmacie STRASBOURG 1966.

34. NIYOGI S. K.
Nature, 1964, 202, 1225.

35. NIYOGI S. K. - CORDOVA V. F. - RIEDERS F.
Nature, 1965, 206, 716.

36. PIERCE A. E.
Pierce Chemical Company ROCKFORD Illinois.

37. ROKUS A. DE ZEEUW
Prog. Chem. Toxicol., USA, 1969, 4, 59-142.

38. RYO NANIKAWA and SUSUMU KATOKU
Yonago Acta Med., 1966, 10, n° 1, 49-55.

39. SCHMIDT G.
"Methods of Forensic Science" (F. Lund Quist Ed.) Vol. 1
p. 374 Wiley Interscience NEW YORK 1962.

40. SIBERT J. E. - FRICKE F. L.
J. Ass. of Anal. Chemistry USA, 1968, 51, n° 3, 619-621.

41. STEVENSON G. W.
Anal. Chem., 1966, 38, n° 13, 1948-1949.

42. STEWART J. F. - DUKE G. B. - WILLCOX J. E.
Anal. Letters USA, 1969, 2, 8, 449-459.

43. STREET H. V.
J. Chromatog., 1969, 41, 358-366.

44. SUNSHINE I.
Amer. Clin. Pathol., 1963, 40, 578.

45. SUNSHINE I. - ROSE E. and LEBEAU J.
Clin. Chem., 1963, 9, 312.

46. SUNSHINE I. and Co.
Handbook of Analytical Toxicology Ed. Chemical RUBBER Co. 1969.

47. TOKI S. - TAKENOUCHI T.
Chem. Pharm. Bull, 1965, 13, 606.

48. TSUKAMOTO H. - YOSHIMURA H.
Pharm. Bull. Japan, 1955, 3, 397.

49. TSUKAMOTO H. - YOSHIMURA H. - TOKI S.
Pharm. Bull. Japan, 1956, 4, 371.

50. TSUKAMOTO H. - YOSHIMURA H. - TOKI S.
Pharm. Bull. Japan, 1956, 4, 368.

51. TSUKAMOTO H. - YOSHIMURA H. - TOKI S.
Chem. Pharm. Bull., TOKYO, 1958, 6 15.

52. TSUKAMOTO H. - TOKI S. - KANEDA K.
Chem. Pharm. Bull., 1959, 7, 651.

53. VIDIC E. and GOEBEL K.
Arch. Toxikol., 1961, 19, 85.

54. YOSHIMURA H.
Pharm. Bull. Japan, 1957, 5, 561.

55. YOSHIMURA H.
Chem. Pharm. Bull., 1958, 6, 13.

56. WADDELL W. J.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1965, 149, 23.

57. WILLIAMS R. T.
Detoxication mechanism Chapman Hall. Ldt, LONDON 1959.

58. WINSTEN S. - BRODY D.
Clin. Chem., 1967, 13, nº 7, 589-594.

* *
*

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : Hydrolyse chimique	2
CHAPITRE I	3
- Techniques de Chromatographie en couche mince	4
- Techniques de Chromatographie en Phase Gazeuse	11
- Conditions opératoires	15
CHAPITRE II	25
- Phénobarbital	27
- Barbital	47
- Butobarbital	55
- Sécobarbital	67
- Hexobarbital	79
SECONDE PARTIE : Expérimentation sur l'animal	91
- Phénobarbital	93
- Barbital	107
- Butobarbital	117
- Sécobarbital	125
- Hexobarbital	135
CONCLUSIONS GENERALES	145
BIBLIOGRAPHIE	149
TABLE DES MATIERES	155

DEUXIEME THESE

LES IMMUNOSUPPRESSEURS

* * * * *